

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Farmacología**



**Influencia de la hipertensión, la edad y el endotelio en las  
respuestas a nifedipina y Bay Kay K 8644**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María del Carmen Hernández Martín**

**Directora**

**Mercedes Salaices Sánchez**

**Madrid**

**ISBN: 978-84-8466-869-5**

**© María del Carmen Hernández Martín, 1993**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

**TESIS DOCTORAL**

**INFLUENCIA DE LA HIPERTENSION, LA EDAD  
Y EL ENDOTELIO EN LAS RESPUESTAS  
A NIFEDIPINA Y BAY K 8644**

**MEMORIA QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
FARMACIA PRESENTA**

**M<sup>a</sup> DEL CARMEN HERNANDEZ MARTIN**

**MADRID, 1993**



Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología y Terapéutica

**JESUS MARIN LOPEZ y MERCEDES SALAICES SANCHEZ**,  
Catedrático y Profesora Titular, respectivamente, del Departamento de  
Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que **Dña. M<sup>a</sup> DEL CARMEN HERNANDEZ MARTIN** ha  
realizado bajo su dirección el trabajo "**Influencia de la hipertensión, la edad y  
el endotelio en las respuestas a nifedipina y BAY K 8644**" con objeto de  
obtener el Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expedimos el presente Certificado en Madrid a 15  
de Septiembre de mil novecientos noventa y tres.

Directores

Dr. J. Marín López

Dra. M. Salaices Sánchez

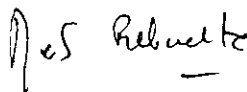
**MERCEDES REBUELTA LIZABE**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que Dña. M<sup>a</sup> **DEL CARMEN HERNANDEZ MARTIN**, ha realizado el trabajo "**Influencia de la hipertensión, la edad y el endotelio en las respuestas a nifedipina y BAY K 8644**" con objeto de obtener el Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expido el presente Certificado en Madrid a 15 de Septiembre de mil novecientos noventa y tres.

Tutora

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mercedes Rebuelta'.

Fdo: Dra. M. Rebuelta Lizabe



*Todo principio es fácil y los últimos peldaños son los más  
difíciles de subir.....*

J. W. Van Goethe

*A mis Padres*

*A Paco*

*A Merche y Elena*

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (90E0959), la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PTR 90-006 y FAR 91-0205) y por los Laboratorios Bayer.

## **AGRADECIMIENTOS**

A La Dra. Mercedes Salaices y al Dr. Jesús Marín, directores de esta Tesis Doctoral, por su constante orientación y estímulo y por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Félix Sánchez-Ferrer, por su colaboración siempre que la he necesitado.

Al Dr. Pedro Sánchez García, Director del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por haberme brindado la posibilidad de llevar a cabo esta Tesis.

A todo el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma, donde he tenido la suerte de encontrar compañeros entrañables dispuestos en todo momento a ayudarme, muy especialmente a Silvia, Ana y M<sup>a</sup> Jesús, cuya ayuda nunca olvidaré y sin la cual no hubiera podido realizar esta Tesis. A Rita, Esther y Jose Luis, por su cooperación en la realización de algunos experimentos. A Miguel Angel, Mayte, Marisol, Carlos, Filomena, Esperanza, Javier y M<sup>a</sup> Angeles por su constante apoyo. A todos ellos por haberme brindado su amistad y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A la Dra. Mercedes Rebuelta, por haber aceptado ser tutora en este trabajo.

Al Dr. Luis Monje, por la aportación de sus conocimientos en la realización del estudio estadístico de este trabajo.

A Enrique Anadón y Henny Hooghuis por haberme cedido generosamente el ordenador cuando lo he necesitado.

A mis padres, por su constante sacrificio.

A Paco, por su infinita paciencia, comprensión y ayuda, sobre todo en los momentos más difíciles.

A Merche y Elena, por su apoyo moral.

A todas aquellas personas que de una u otra manera me han escuchado y alentado a lo largo de todos estos años.

A todos mi más sincera gratitud

## **INDICE**

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1. Mecanismos implicados en la contracción del músculo liso .....	3
2. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en la contracción vascular.....	7
2.1. Mecanismos que median la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ del espacio extracelular.....	7
2.2. Mecanismos que median la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ de depósitos intracelulares.....	15
2.3. Mecanismos responsables de la reducción de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ y mantenimiento de la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$ .....	20
3. Moduladores de los movimientos de $\text{Ca}^{2+}$ .....	22
3.1. Antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$ .....	23
3.2. Clasificación de los moduladores de los movimientos de $\text{Ca}^{2+}$ según Godfraind (1987).....	24
3.3. Mecanismo de acción de los antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$ .....	28
3.4. Acciones vasculares de los antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$ .....	30
3.5. Aplicaciones clínicas de los antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$ .....	31
3.6. Agonistas de $\text{Ca}^{2+}$ .....	33
4. Papel del endotelio en las respuestas vasculares.....	34
5. Fisiopatología de la hipertensión .....	39
5.1. Modelos animales de hipertensión genética .....	40
5.2. Metabolismo del $\text{Ca}^{2+}$ en la hipertensión .....	41
5.3. Endotelio vascular e hipertensión .....	54
5.4. Disfunciones adrenérgicas en la hipertensión .....	56
5.5. Sistema renina-angiotensina en la hipertensión .....	58
6. Cambios cardiovasculares asociados con la edad .....	59
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>62</b>

<b>MATERIAL Y METODOS</b>	64
1. Estudio de la reactividad vascular	65
1.1. Estudio de las respuestas del antagonista de $\text{Ca}^{2+}$ nifedipina	68
1.2. Estudio de las respuestas del agonista de $\text{Ca}^{2+}$ BAY K 8644	69
2. Medida de la presión arterial en las ratas	69
3. Fármacos empleados	70
4. Análisis estadístico	70
<b>RESULTADOS</b>	72
1. Evolución de la presión sanguínea	72
2. Curvas concentración-respuesta a nifedipina	74
2.1. Influencia de la cepa sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina	74
2.2. Influencia de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina	91
2.3. Influencia del endotelio en las curvas concentración-respuesta a nifedipina	100
3. Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644	114
3.1. Influencia del grado de despolarización de las arterias sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644	121
3.2. Influencia de la cepa sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644	121
3.3. Influencia de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644	135
3.4. Influencia del endotelio sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644	144

4. Estudio estadístico de la población global por medio del análisis de la varianza de tres factores (ANOVA) .....	151
4.1. Estudio de las curvas concentración-respuesta a nifedipina.....	151
4.2. Estudio de las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644.....	156
<b>DISCUSION</b> .....	160
1. Influencia de la hipertensión en las respuestas vasculares a los moduladores de la entrada de $Ca^{2+}$ .....	162
1.1. Efectos de la nifedipina .....	163
1.2. Efectos del BAY K 8644 .....	167
2. Influencia de la edad en las respuestas vasculares a los moduladores de la entrada de $Ca^{2+}$ .....	170
2.1. Efectos de la nifedipina .....	170
2.2. Efectos del BAY K 8644 .....	173
3. Papel del endotelio en las respuestas vasculares a los moduladores de la entrada de $Ca^{2+}$ .....	174
3.1. Efectos de la nifedipina .....	175
3.2. Efectos del BAY K 8644 .....	178
<b>CONCLUSIONES</b> .....	180
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	182



## ABREVIATURAS

- $\omega$ -Cg Tx =  $\omega$ -conotoxina
- AMPc = adenosin monofosfato cíclico
- $[Ca^{2+}_{int}]$  = calcio intracelular
- CDR = canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de receptores
- CMD = calmodulina
- CVD = canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes
- D-glucosa 6P = D-glucosa 6 monofosfato
- DG = diacilglicerol
- IP = inositol fosfato
- $IP_3$  = inositol trifosfato
- kDa = kilodalton
- MLCK = miosina de cadena ligera
- mV = milivoltios
- NA = noradrenalina
- PI = fosfatidil inositol
- PIP = fosfatidil inositol monofosfato
- $PIP_2$  = fosfatidil inositol difosfato
- PO<sub>2</sub> = presión parcial de oxígeno
- pS = picosiemens
- SHR = rata espontaneamente hipertensa de Aiko-Okamoto
- SHRSp = "stroke-prone spontaneously hypertensive rats"
- WKY = rata Wistar-Kyoto

## ***INTRODUCCION***

---

La preocupación por el envejecimiento de la población es muy importante en los países occidentales, como se desprende del hecho de que diversas entidades y organismos de ámbito internacional estén desarrollando un importante esfuerzo en el estudio de los mecanismos implicados en este proceso. Concretamente, el estudio del área cardiovascular, responsable de más del 50 % de la morbilidad en los ancianos ha sido reconocido como uno de los temas prioritarios de investigación. Dentro de las alteraciones del sistema cardiovascular, la patología hipertensiva que incide de manera importante en estos pacientes, reviste particular importancia, teniendo en cuenta además, que su etiología y mecanismos fisiopatológicos siguen siendo básicamente desconocidos (Lau y Eby, 1985; Birkenhager y col., 1988).

Existen numerosos mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión, así como su relación con la edad. En los últimos años, se ha prestado especial atención al estudio de los mecanismos que modulan el tono vascular local, cuyo papel fisiológico en la regulación del flujo sanguíneo en los diferentes órganos adquiere una importancia creciente. En este sentido, es conocido que el endotelio juega un papel crucial en el control del tono vascular a través de la liberación de factores vasodilatadores y/o vasoconstrictores (Marín y Sánchez-Ferrer, 1990; Sánchez-Ferrer y Marín, 1990). Asimismo, se ha demostrado la existencia de cambios vasculares producidos por la edad y la hipertensión que alteran el endotelio y el músculo liso que pueden ser la base de la alteración de las respuestas vasomotoras.

Por otra parte, hay que reseñar que para que se origine el proceso de contracción del músculo liso vascular es necesario que aumenten las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular (Cauvin y col., 1983; Epstein y col., 1985; Ebashi y Ogawa, 1988; Nayler, 1988). El calcio utilizado por los agentes vasomotores para producir este proceso puede provenir del medio extracelular y/o del intracelular. En

la actualidad, se dispone de fármacos capaces de interferir con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, bien bloqueándola con los ya clásicos antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la nifedipina, o activándola con los fármacos denominados "agonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ " como el BAY K 8644 (Schramm y col., 1983). La utilización de estos fármacos constituye un instrumento de investigación muy útil para estudiar todos aquellos procesos fisiológicos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen herramientas terapéuticas muy utilizadas en el tratamiento de alteraciones cardiovasculares como la hipertensión, especialmente en ancianos (Wenger, 1988; Wei y col. 1989; Calvo-Gómez y col., 1992).

Este trabajo ha tenido como objetivo estudiar la influencia de la hipertensión, la edad y el endotelio sobre las respuestas vasculares a los moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , nifedipina y BAY K 8644. Por consiguiente, en esta Introducción se realizará una revisión del estado actual de los conocimientos sobre:

1º) Los mecanismos implicados en la contracción vascular

2º) Papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la contracción vascular

3º) Modulación de los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$

4º) Papel del endotelio en las respuestas vasculares

5º) Fisiopatología de la hipertensión

6º) Cambios cardiovasculares asociados con la edad

## 1.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

Cuando se produce un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular,  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}]$  por entrada del mismo a través de los canales de la membrana plasmática o por salida de los orgánulos intracelulares (retículo sarcoplásmico y mitocondria), se ponen en funcionamiento una serie de procesos fisiológicos que conducen a la contracción del músculo liso vascular.

El músculo liso posee un aparato contráctil constituido básicamente por dos proteínas, actina y miosina de estructura filamentosa como se ha demostrado por estudios de microscopía electrónica y difracción de rayos X (Lowy y col., 1970; Shoenbergz y Haselgrove, 1974). En un corte transverso de músculo liso vascular, se puede observar la existencia de un filamento delgado constituido por actina y tropomiosina y otro grueso formado por miosina (Somlyo, 1980; Somlyo, 1985; Chalovich, 1993).

La actina es una proteína contráctil globular de cadena única y peso molecular 42 kDa dispuesta en forma helicoidal en dos filamentos alrededor de la tropomiosina. La miosina es una proteína hexamérica formado por dos subunidades de alto Peso molecular (cadenas pesadas) y cuatro subunidades de bajo Peso molecular (cadenas ligeras). Las cadenas pesadas forman una cola en espiral con dos regiones protuberantes o "cabezas" que contienen las zonas de unión con la actina (Adelstein y Hathaway, 1979; Somlyo, 1980; Somlyo, 1985).

Para que se desencadene todo el proceso fisiológico de la contracción, el  $\text{Ca}^{2+}$  necesita unirse a una proteína citoplasmática denominada calmodulina (CMD). La CMD es considerada como el mediador más importante en los procesos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Está formada por una cadena única de aminoácidos, que es

resistente a pH ácido y termoestable (Winkler y col.,1987; Ping Lu y Means, 1993).

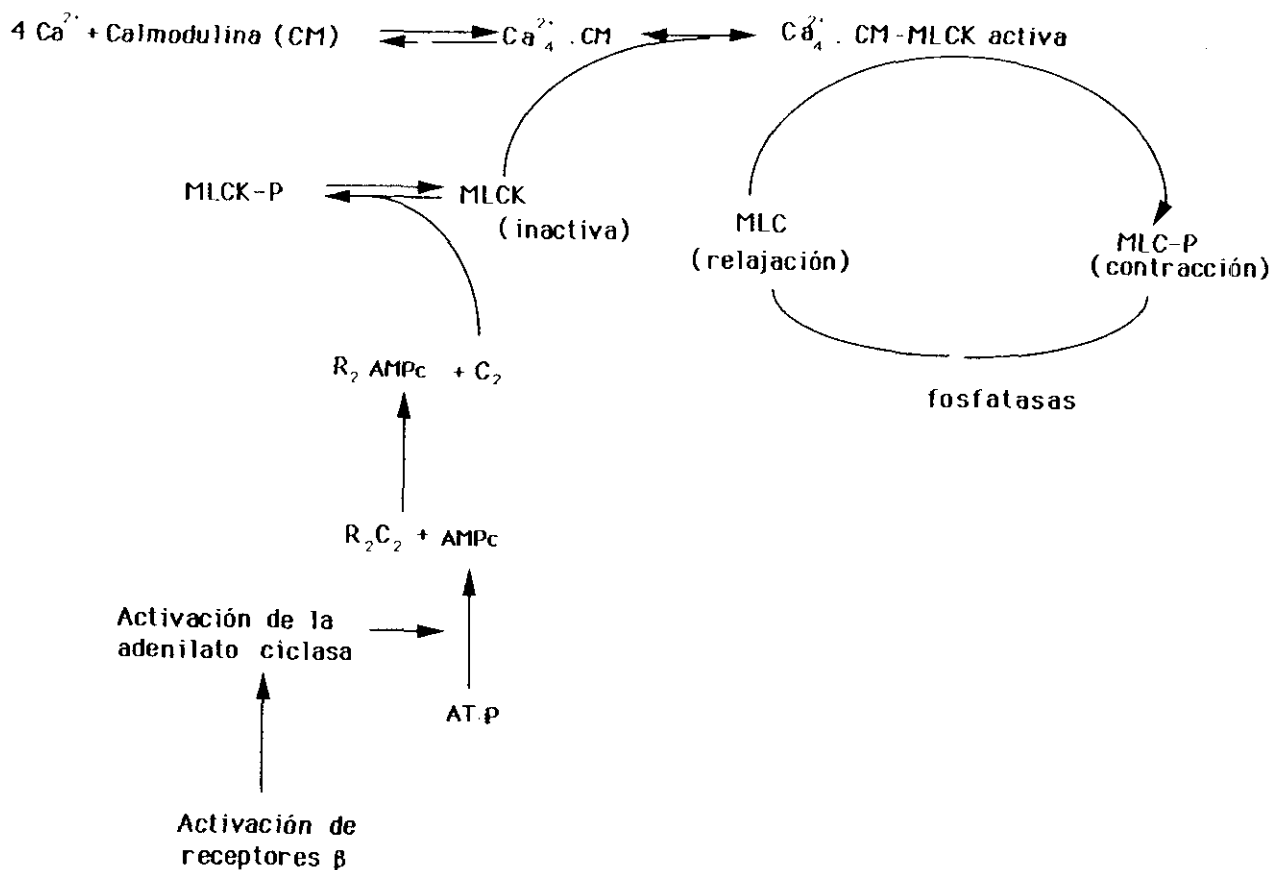
Esta CMD presenta cuatro sitios de unión para el  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo su afinidad por este catión dependiente de la concentración intracelular del mismo. Así, cuando se produce un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{int}}]$  de aproximadamente  $10^{-6}$  M, ya sea por apertura de los canales correspondientes y entrada desde el exterior, por liberación de los orgánulos intracelulares o por combinación de ambas, se produce un acoplamiento del ión  $\text{Ca}^{2+}$  a la CMD en los sitios de unión. De los cuatro sitios de unión a la CMD, dos están unidos permanentemente al ión y el tercero y posiblemente el cuarto, probablemente sean los encargados de captar la nueva entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Means y col., 1991).

Este complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CMD, se une a la unidad catalítica de la enzima miosina cinasa de cadena ligera, formando un complejo ( $\text{Ca}^{2+}$ -CM-MLCK) holoenzimático activo que cataliza la transferencia de grupos fosfato del complejo  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP a la cadena ligera (Stull y col.,1982; Harstorne, 1987; Ikebe y Reardon, 1989; Means y col., 1991; Schulman y Hanson, 1993). Este proceso estimula las interacciones actina-miosina.

Cuando el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es menor de  $10^{-6}$  M, aparece la relajación como consecuencia de la desactivación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CM-MLCK (Winkquist y col., 1984), inactivándose la miosina por medio de la desfosforilación originada por fosfatasas (Pato y Aldestein, 1980; Jmari y col.,1986; England, 1986; Rasmussen, 1986; Marín, 1988; DeLanerolle y Paul., 1991)(Fig.1).

La  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{int}}]$  se reduce por cualquiera de los mecanismos siguientes: 1º) Aumento del secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por los orgánulos celulares de depósito. 2º) Disminución del flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. 3º) Aumento de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior celular (Morgan y Morgan, 1984; Jmari y col.,1986; Silver, 1986; Marín, 1988; Raeymaekers y col., 1990). Así, se ha comprobado que

los estímulos originados por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos dan lugar a una activación de la adenilatociclase con la consiguiente formación de AMPc. Este nucleótido cíclico origina la fosforilación de la cinasa de la miosina de cadena ligera (MLCK), dando lugar a una marcada inhibición enzimática, disminuyendo hasta 20 veces la afinidad de la MLCK fosforilada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CMD (Conti y Adelstein, 1981) produciendo relajación. Por otro lado, la proteincinasa dependiente de AMPc, estimula la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente de la membrana, lo que da lugar a una facilitación de la entrada de  $\text{K}^+$  y de la salida de  $\text{Na}^+$  del músculo liso, activándose a su vez la entrada de  $\text{Na}^+$  y salida de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por medio del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .



**Fig.1.-** Mecanismos intracelulares implicados en la contracción del músculo liso. Cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el espacio intracelular se unen a la calmodulina (CM), activándose la miosincinasa de cadena ligera (MLCK), que fosforila a la miosina de cadena ligera (MLC), interaccionando ésta con la actina para originar el proceso fisiológico de la contracción. Las fosfatasas, al actuar por desfosforilación de la molécula de miosina de cadena ligera (MLC) causan relajación. Cuando los agonistas  $\beta$  adrenérgicos se unen a su receptor, se produce la activación del enzima adenilatociclasa que aumenta los niveles de AMPc. El AMPc activa una proteincinasa que fosforila la miosincinasa de cadena ligera (MLCK), reduciendo su afinidad por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CM apareciendo relajación.



## **2.- PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA CONTRACCION VASCULAR**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es considerado como el mensajero iónico del proceso contráctil del músculo liso vascular, en la actualidad es considerado como el segundo mensajero más extendido. Transporta señales recibidas desde la superficie de la célula al interior de la misma. Se ha comprobado que la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es aproximadamente  $0,1 \mu\text{M}$ , es decir unas 10.000 veces menor que la extracelular, que es de  $1 \text{ mM}$ . Cuando las células son estimuladas, la concentración, puede incrementarse hasta  $10 \mu\text{M}$  (Bolton, 1979; Rasmussen, 1986; Marín, 1988; Missiaen, 1992).

Las células tienen una batería de mecanismos por medio de los cuales regulan los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ello, controlan el movimiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (Saida y Van Breemen, 1983; Daniel, 1985; Wuytack y Raeymaekers, 1992), la mitocondria (Brand, 1988; Gunter y Pfeiffer, 1990) y membrana del retículo sarcoplásmico (Somlyo y col., 1971; Chen y Van Breemen, 1992). Aunque la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la membrana plasmática permanezca constante, el flujo a través de la misma puede variar significativamente.

### **2.1.- Mecanismos que median la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ del espacio extracelular**

La magnitud de los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la células, durante su activación, ha sido determinada por medidas del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Hay distintos mecanismos que median este flujo. De todos ellos hay que destacar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular a través de los correspondientes canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la membrana de las células.

En la actualidad se conocen cuatro canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : tres de ellos definidos como canales excitables y un cuarto canal pasivo o de "goteo". Dentro de los canales excitables, los más importantes son los activados por despolarización de la membrana o canales voltaje-dependientes (CVD) y los activados como consecuencia de la interacción de un agonista con su receptor o canales dependientes de receptores (CDR) (Hurwitz, 1986). Algunos autores han demostrado la existencia de un tercer canal de  $\text{Ca}^{2+}$  excitable, activado cuando se produce un proceso de distensión mecánica (Kirber y col., 1987).

### **2.1.1.-Canales voltaje-dependientes (CVD)**

Los canales voltaje-dependientes (CVD) han sido descritos en una gran variedad de preparaciones de músculo liso vascular incluyendo: venas porta (Loirand y col., 1986, 1991) y azigos de rata (Hermsmeyer, 1991), vena safena de perro (Yatari y col., 1987; Takata y col., 1992), en células de aorta de rata, perro y humanas (Friedman y col., 1986; Abkarali y col., 1992; Gelband y Hume, 1992), arteria mesentérica de rata (Bean y col., 1986), aorta y basilar de cobaya (Caffrey y col., 1986; Simard, 1991), aorta de rata (Toro y Stefani., 1987), arteria de la oreja y cerebrales de conejo (Benham y col., 1987; Worley y col., 1991).

El canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , al igual que otros canales iónicos, es una estructura macromolecular glicoproteica que se encuentra en todas las membranas excitables. Está constituido por una zona central formada por un poro acuoso que, junto con el filtro selectivo que se encuentra en la parte externa, controlan los iones que pasan del espacio extracelular (Glossmann y Ferry, 1983; Janis y Triggle, 1984; Stanfield, 1986).

Estos CVD presentan las siguientes características: 1º) La señal de la membrana originada en estos canales depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. 2º) Son independientes de la concentración de  $\text{Na}^+$  externa. 3º) Son insensibles a la

tetradotoxina. 4º) Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  pueden ser reemplazados por  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ . 5º) Son inhibidos por los cationes  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y por los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  orgánicos.

La inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no sólo depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Stanfield, 1986), sino también del potencial de membrana (Lee y col., 1985; Ruff, 1986). A lo largo de una despolarización, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no permanecen siempre abiertos, sino que pueden estar en transición entre tres estados: abierto, reposo e inactivado.

Se han descrito tres estados modales de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : **modo 1**, el canal está en un estado transitorio entre la forma abierta y cerrada, **modo 2**, el canal está abierto por prolongados períodos de tiempo, interrumpidos por cierres breves y **modo 0**, donde el canal permanece cerrado. La acción de las dihidropiridinas (potentes antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ha sido explicada en base a sus efectos sobre estos distintos estados del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hess y col., 1984; Spedding y Paoletti, 1992).

Mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas de "patch-clamp", que permiten medir la corriente que atraviesa un único canal, se ha llegado a la conclusión de la existencia de más de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependiente (Pelzer y col., 1990, Spedding y Paoletti, 1992). Estos CVD pueden ser diferenciados por su comportamiento cinético, dependencia del voltaje, conductancia, selectividad y sensibilidad a antagonistas orgánicos e inorgánicos del  $\text{Ca}^{2+}$ . Han sido aceptados al menos dos clases de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : unos activados a bajo voltaje y otros activados a alto voltaje. Los de bajo voltaje, también han sido denominados canales **T**. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados a alto voltaje han sido divididos a su vez en tres tipos: **L**, **N** y **P**.

- **Canal L.** Su nombre se debe al término "long lasting". Sus características fueron descritas primero por Nowycky y col. (1985) en ganglio dorsal de pollo. Posteriormente, se han identificado en músculo liso vascular (Högestatt y Anderson, 1984; Sims, 1992), músculo cardíaco (Hagiwara, 1988; Schreibmayer y col., 1992) y neuronas (Spedding, 1987; Regehr y col., 1989; Westenbroek y col., 1990; McCarthy y Tanpiengco, 1992).

La estructura del canal tipo L ha sido ampliamente estudiada en músculo esquelético (Tanabe y col., 1987). Como se observa en la figura 2, está constituido por cinco subunidades polipeptídicas con distinto Peso molecular: subunidad  $\alpha_1$  (175 kDa), que forma el canal iónico y contiene un sitio de unión para las dihidropiridinas y fenilalquilaminas (Ellis, 1988); subunidad  $\alpha_2$  (143 kDa), asociada a la subunidad  $\alpha_1$  y tres subunidades de bajo Peso molecular:  $\beta$  (54 kDa),  $\gamma$  (30 kDa) y  $\delta$  (27 kDa) (Takashashi, 1987 a,b; Catterall, 1988; Campbell y col., 1988; Spedding y Paoletti, 1992).

Este canal presenta una conductancia de 25 pS. Su umbral de activación es de -10 mV. La inactivación del canal es muy lenta, con un rango de activación comprendido entre -60 mV y -10 mV.

Se ha descrito la existencia de un modulador endógeno en el cerebro que interacciona con el receptor dihidropiridínico del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, pudiendo modular el estado de activación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bertolino y Llinás, 1992).

- **Canal T.** Este canal debe su nombre a la expresión "transient" y ha sido fundamentalmente aislado en neuronas (Fox y Nowycky, 1987 a,b), donde es responsable de la actividad oscilatoria neuronal. También se ha descrito en músculo liso (Bean y col., 1986; Benham y col., 1987). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T sólo requieren una débil despolarización para su activación, se activan aproximadamente a potenciales de -70 mV, siendo su inactivación muy rápida con un rango entre -100

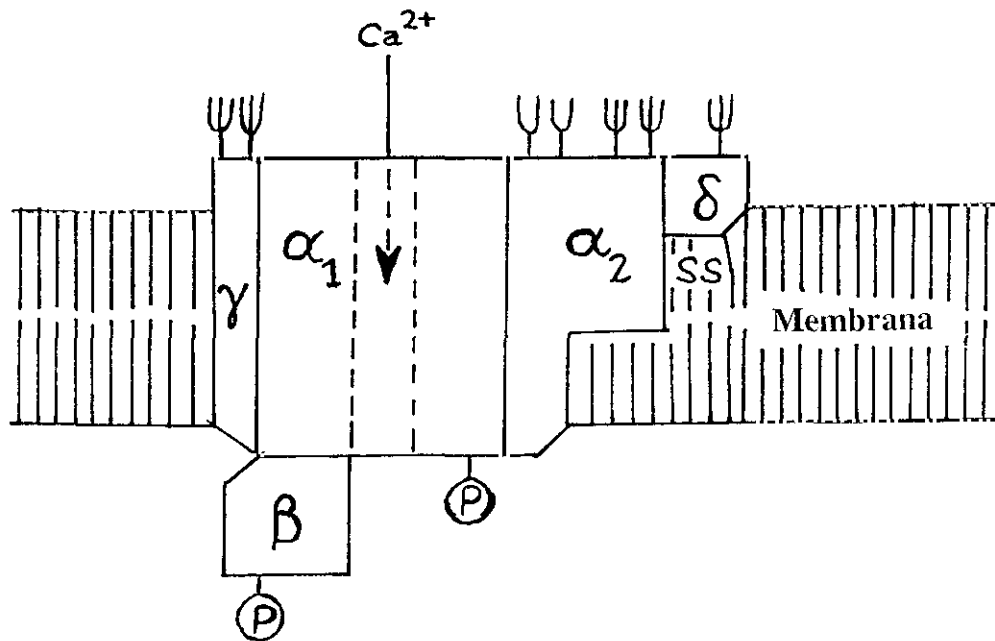
mV y -60 mV. Presenta una conductancia de 8 pS. La estructura de este canal aún no ha sido determinada.

Es un canal relativamente insensible a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  de naturaleza dihidropiridínica, mientras que es inhibido por la acción del amiloride, compuesto con características diuréticas que bloquea los intercambios de transmembrana  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Tang y Morad, 1988).

- **Canal N.** Inicialmente se denominó así por ser no L no T. Ha sido aislado en terminaciones nerviosas, y juega un papel importante en algunas formas de liberación de neurotransmisores (Fox y col., 1987 a,b). También se ha descrito en células musculares lisas de íleon de rata (Mogul y Fox, 1991; Smirnov y col., 1992). Este canal es insensible a dihidropiridinas y es bloqueado por  $\omega$ -conotoxina ( $\omega$ -Cg Tx), péptido aislado de un caracol marino, *Conus geographicus*.

- **Canal P.** Este canal se ha descrito en células del sistema nervioso y se denomina así porque en un principio fueron descritos en células de Purkinje (Tank y col., 1988; Llinás y col., 1989a,b; Mintz y col., 1992). Este canal presenta una conductancia de 10 a 15 pS, se bloquea por FTX (toxina producida por una araña),  $\text{Cd}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ , pero no es inhibido por sustancias de naturaleza dihidropiridínica o  $\omega$ -Cg Tx. Estos canales han sido descritos en otras regiones como retina (Sullivan y Lasater, 1990) e hipófisis (Obaid y col., 1990).

## CANAL DE $\text{Ca}^{2+}$



**Fig. 2.-** Organización de las subunidades que constituyen el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Bertolino, 1992).

### **2.1.2.- Canales dependientes de receptores (CDR)**

Bolton (1979) definió un segundo tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual se abre tras el acoplamiento del agonista con su receptor. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de esos canales desencadena una serie de procesos celulares que dan como resultado final la contracción del músculo liso. Este canal recibió el nombre de canal dependiente de receptores (CDR). Se ha propuesto que estos CDR son distintos de los CVD (Meisheri y col. 1981; Khalil, 1987). El hecho de que la unión de un agonista a su receptor dé lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio celular, hace suponer la existencia de mensajeros intracelulares secundarios que modulan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Actualmente se duda de si estos canales tienen entidad propia o son los mismos que los CVD (Nelson y col., 1990; Pacaud y col., 1991). Las razones para ello son: 1º) Los agonistas de receptores en muchas ocasiones producen despolarizaciones de las células (Nelson y col. 1990). 2º) Los agonistas pueden abrir directamente los CVD (Benhan y Tsien, 1987a; Nelson y col., 1990; Pacaud y col., 1991) incluso en ausencia de despolarización. 3º) Los CDR no han podido ser aislados ni identificados con técnicas de patch-clamp.

Por otra parte, la activación de diferentes receptores acoplados a proteínas G, estimulan la formación de fosfoinosítoles, que al actuar sobre receptores específicos del retículo sarcoplásmico, fundamentalmente el  $\text{IP}_3$ , inositol trifosfato son capaces de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de dicho depósito intracelular, el cual contribuye de forma importante a la respuesta contráctil de un determinado agonista (Abdel-Latif, 1986; Rasmussen, 1986; Chiu y col., 1987; Neylon y Summers, 1987; Marín, 1988; Akbar y col., 1989; Nishimura y col., 1989; Berridge, 1992). Este proceso se describirá posteriormente con mas detalle.

### **2.1.3.- Canales de $\text{Ca}^{2+}$ activados por distensión mecánica**

Se ha comprobado que un aumento en la presión intravascular o distensión del vaso puede producir un aumento mantenido del tono del músculo liso que depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Bohr y Webb, 1988). Recientemente se ha verificado que esta distensión puede estimular la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (Laher y col., 1988) a través de canales que pueden abrirse por cationes no específicos (Kirber y col., 1987). Bevan y col. (1986) han indicado que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por distensión vascular se produce por unos canales diferentes de los CDR o CVD. Esta diferencia se basa en que presentan distinta sensibilidad a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , llegando a ser sensibles al diltiazem e insensibles a dihidropiridinas.

No está aún claro, el mecanismo a partir del cual se origina la activación de dichos canales, aunque algunos estudios indican que el endotelio posee un papel intermediario en este proceso (Katusic y col., 1986; Harder, 1987).

### **2.1.4.- Entrada pasiva de $\text{Ca}^{2+}$**

No se conoce muy bien como se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula en condiciones basales. Se ha sugerido la participación de lugares cargados negativamente, formando parte de ellos grupos fosfato y carboxilo. Este canal se define como un camino de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de estimulación del músculo liso vascular por despolarización, agonistas o distensión mecánica. Se ha comprobado que origina movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ , que no requieren una apertura periódica de los canales específicos. El canal de "goteo" se inhibe por un aumento en la concentración de hidrogeniones (Van Breemen y col., 1972) y cationes polivalentes como el  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  originando un bloqueo del canal del 66%.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este canal está constantemente compensada por el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del retículo sarcoplásmico y salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al



espacio extracelular.

## **2.2.- Mecanismos que median la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ de depósitos intracelulares**

### **2.2.1.- Retículo sarcoplásmico**

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de organelas intracelulares ha sido evaluada por distintas técnicas experimentales que miden la contracción vascular en ausencia o presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Leijten y Van Breemen, 1984), la señal de indicadores intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kobayashi y col., 1985) o por medidas de flujos de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en células intactas y químicamente impermeabilizadas (Leijten y Van Breemen, 1984; Saida y Van Breemen, 1984).

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico parece ser que está mediada por dos segundos mensajeros  $\text{IP}_3$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge, 1992). En la Fig. 3 se esquematiza el mecanismo a través del cual se origina la formación de fosfoinosítoles en respuesta al acoplamiento agonista-receptor. Se efectúa a partir del ácido fosfatídico, el cual proporciona una molécula de D-glucosa 6 P que al unirse al D-inositol origina unos productos intermedios que dan como resultado el fosfatidil inositol (PI). Este proceso se desarrolla en el retículo sarcoplásmico (Gould y col., 1983; Parrier y Holkin-Neaveron, 1984; Ghalayani y Eichberg, 1985). El PI es transportado a la membrana plasmática, en donde se origina su fosforilación por ATP y dos cinasas específicas de la membrana originando fosfatidil inositol monofosfato (PIP) y fosfatidil inositol difosfato ( $\text{PIP}_2$ ) (Downes y Michell, 1982).

Cuando se estimula un receptor de la membrana, se activa la fosfolipasa C que hidroliza el PI o sus derivados para dar lugar al diacilglicerol (DG) y a sus correspondientes inosítoles fosfatos (Abbed-Latif, 1986; Berridge, 1989) como son IP (inositol fosfato),  $\text{IP}_2$  (inositol 1,4 difosfato) e  $\text{IP}_3$ . Existen dos enzimas llamadas

inositol polifosfato fosfomonoesterasa y fosfatasa encargadas de degradar los inositol polifosfatos hasta D-inositol y P orgánico. Esta degradación se origina en la membrana plasmática y citoplasma, siendo dependiente del  $Mg^{2+}$  (Storey y col., 1984; Connolly y col., 1985). Recientemente se ha caracterizado un nuevo fosfoglicerido el inositol fosfato,  $IP_4$  (inositol 1,3,4,5 tetrafosfato) en células endoteliales (Luckoff y Clapham, 1992). Estudios realizados en células acinares han revelado que el  $IP_4$  induce la entrada de  $Ca^{2+}$  pero sólo en combinación al  $IP_3$  (Irvine, 1990).

El segundo mensajero, DG puede seguir tres caminos distintos (Nishizuka, 1988): 1º) Metabolizarse vía lipasas a ácido araquidónico. 2º) Fosforilarse con ATP en la membrana plasmática, originando ácido fosfatídico (PA), cerrando de esta manera el ciclo. 3º) Activar una proteincinasa C para dar distintas respuestas fisiológicas. A nivel vascular la activación de la proteincinasa C contribuye a la respuesta contráctil por mecanismos no bien conocidos uno de ellos puede ser porque incrementa la sensibilidad del aparato contráctil al  $Ca^{2+}$  y porque parece estar implicada en la desensibilización de receptores (Salaices y col., 1990).

El  $IP_3$  se une a un receptor específico de la superficie de la membrana del retículo sarcoplásmico, produciéndose un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  citoplasmática (Irvine, 1986; Khalil y col., 1987; Berridge y col., 1989; Mikhoshiba, 1993). Recientes estudios isotópicos han demostrado que esta unión es de alta afinidad (Baukal y col. 1985). Como consecuencia de la misma, se abre un canal de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico que aumenta las concentraciones de este ión en el citoplasma (Erlich y Watras, 1988; Bezprozvanny y col., 1991). Se ha sugerido que el receptor intracelular para el  $IP_3$  es el propio canal de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Callewaert, 1992; Mikhoshiba, 1993).

Según Dawson e Irvine (1984), el  $IP_3$  no es capaz de liberar todo el  $Ca^{2+}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico y se ha sugerido la existencia de un "pool"

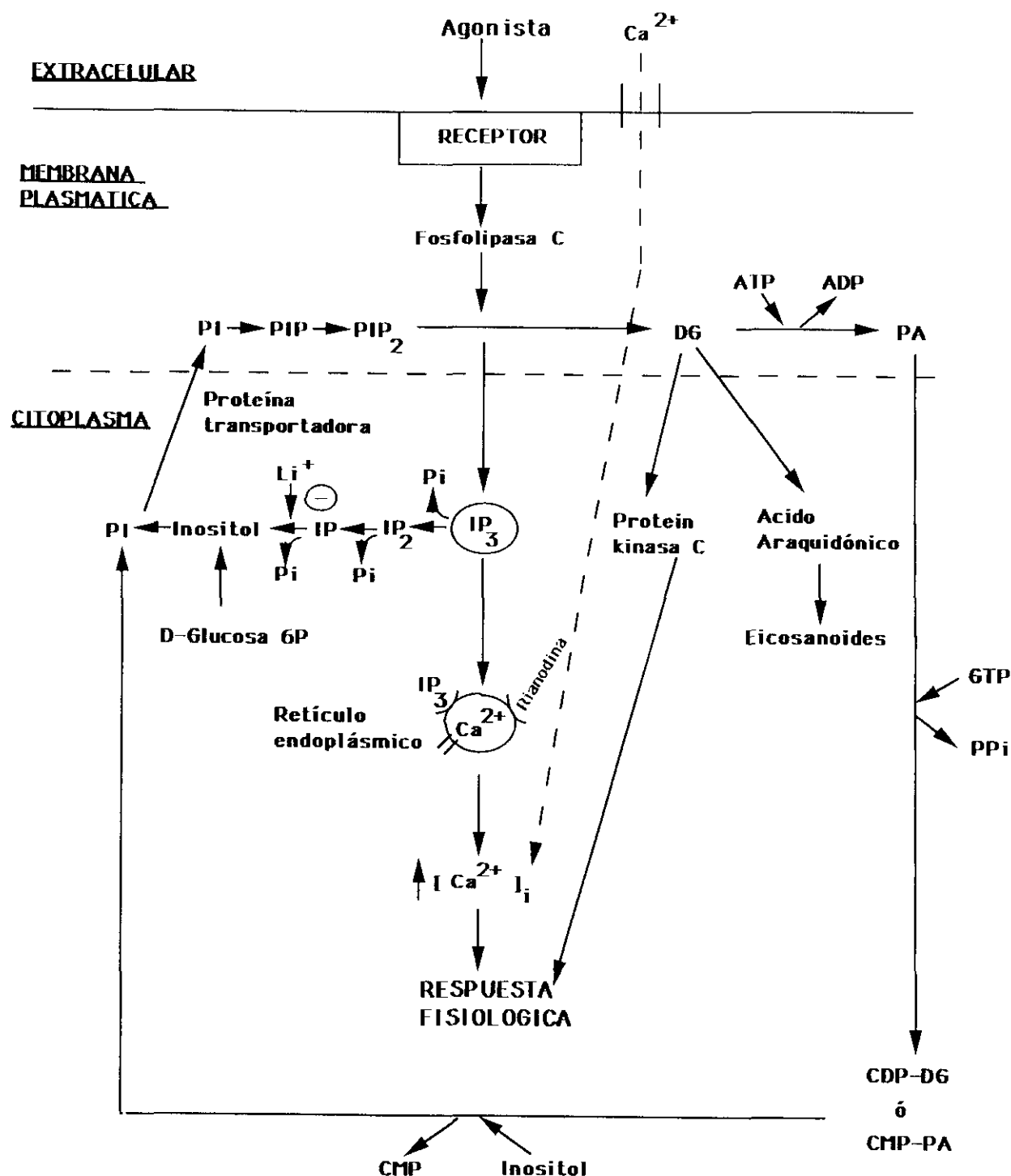
de  $\text{Ca}^{2+}$  activador en el retículo sarcoplásmico, de manera que los receptores para  $\text{IP}_3$  no estarían distribuidos de manera uniforme por toda la superficie, sino localizados en una región particular próxima a la membrana plasmática (Irvine, 1986; Chen y Van Breemen, 1992). Por otro lado, parece que el propio  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico serviría de señal que modularía la formación de  $\text{IP}_3$  (Berman y Goldman, 1992).

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico puede ser producida por otros estímulos diferentes del  $\text{IP}_3$ , así ésta puede ser inducida por el mismo  $\text{Ca}^{2+}$ . Este hecho se demostró originalmente en músculo esquelético y posteriormente se ha comprobado en músculo cardíaco (Callewaert, 1992). De acuerdo con esta teoría, la entrada rápida de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula dispara la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en él existentes. De esta forma se incrementan las  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  necesarias para iniciar el proceso de contracción.

Se ha demostrado que cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alrededor del retículo sarcoplásmico aumenta a  $3 \cdot 10^{-6}$  M comienza la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Saida, 1982). La procaina inhibe completamente la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de este retículo (Saida y Van Breemen, 1984).

Mediante la utilización del alcaloide rianodina, se ha comprobado otro lugar de fijación en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico distinto al del  $\text{IP}_3$  que al ser activado provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Meissner 1986; Lattanzio y col., 1987; Smith, 1988; Koch y col., 1990). Este receptor para rianodina ha sido identificado tanto en músculo esquelético como músculo liso vascular y cardíaco (McPherson y col., 1991; Berprozvanny, 1991; Lesh y col., 1993), aunque se ha comprobado que es el que produce una mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo estriado, está expresado en niveles más bajos en el músculo liso vascular (Marks, 1992).

Estudios recientes suponen la existencia de una heterogeneidad en la naturaleza del receptor para  $IP_3$  en los distintos sistemas (Erlich y Watras, 1988; Sudhof y col., 1991; Mikoshiba, 1993), así como múltiples formas de receptores para rianodina (Sorrentino y Volpe, 1993)



**Fig.3.** - Ciclo de biotransformación de los fosfatidil inosítoles inducido por la interacción del agonista con su receptor específico.

**DG** = 1,2 diacilglicerol.; **PA** = ácido fosfatídico; **PI** = fosfatidil inositol; **PIP** = fosfatidil inositol 4 fosfato; **PIP<sub>2</sub>** = fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; **IP** = inositol 1 fosfato; **IP<sub>2</sub>** = inositol 1,4 bifosfato; **IP<sub>3</sub>** = inositol 1,4,5 trifosfato; **Pi** = Fósforo inorgánico; **PPi** = pirofosfato inorgánico; **GTP** = guanosín trifosfato; **CMP-PA** = citidín monosfosfato-ácido fosfatídico; **CMP** = citidín monofosfato.

### **2.2.2.- Mitocondria**

La mitocondria es un orgánulo en donde se puede acumular  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque en condiciones fisiológicas es en el retículo sarcoplásmico en donde se produce una acumulación mayor de dicho ión. En estas condiciones fisiológicas, el ión mayoritario en la mitocondria es el  $\text{PO}_4\text{H}_2^{2-}$ , dando lugar a la formación de fosfatos cálcicos, siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  un regulador de la producción de ATP mitocondrial (Brand y col., 1988; Denton y McCormack, 1990; Gunter y Pfeiffer, 1990). Es probable que en situaciones patológicas, como la anoxia, las mitocondrias puedan actuar como reservorios de emergencia para reducir el excesivo  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en el interior de las células musculares lisas (Hansford, 1985; Somlyo y col., 1986; Broderick y Somlyo, 1987).

### **2.3.- Mecanismos responsables de la reducción de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ y mantenimiento de la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$**

Altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son tóxicas para la células, pudiendo producir la muerte celular. Las membranas celulares, además de otras funciones fisiológicas, son responsables del mantenimiento de la homeostasis cálcica celular, siendo el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular la señal que activa una serie de mecanismos que facilitan su eliminación. Además de la membrana plasmática, existen otras dos membranas que contribuyen a mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica como son: la membrana del retículo sarcoplásmico y la mitocondrial.

Los mecanismos celulares responsables de la reducción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático son: 1º) La ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  de la membrana plasmática. 2º) El sistema de intercambio  $3 \text{Na}^+ / 1 \text{Ca}^{2+}$  acoplado a la ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -dependiente. 3º) La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. 4º) La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP en el retículo sarcoplásmico con propiedades distintas a las de la membrana plasmática.

La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmática elimina  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, al tiempo que introduce protones, en proporción de  $2\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$ . Puede distinguirse de otras ATPasas plasmáticas y del retículo sarcoplásmico por su insensibilidad a ouabaína (a diferencia de la ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -dependiente), alta sensibilidad a la inhibición por vanadato (más sensible que la ATPasa del retículo endoplásmico), sensible a  $\text{K}^+$  y a los antagonistas de la calmodulina (Wuytack y col., 1987; Wuytack y Raeymaekers, 1992; Raeymaekers y Wuytack, 1993).

En cuanto a los mecanismos que regulan la actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico son muy variados, en función del tipo de tejido. De manera general, un aumento de  $\text{AMP}_c$ , las prostaglandinas (Lockette y col., 1980), nitroprusiato (Rapoport y Murad, 1983), agentes colinérgicos (Godfraind y Fagoo, 1986; Hootman y col., 1987) y agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Lynch y col., 1986; Navran y col., 1988) estimulan la actividad de este enzima. Por el contrario, la actividad se bloquea por ouabaína (Barry y col., 1985; Blaustein, 1985; Kirtley y col., 1990).

La ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -dependiente ha sido descrita en aurícula y ventrículo cardíacos (Rasmussen, 1986), músculo liso vascular (Kondo y col., 1979), sistema nervioso central (Lichtstein y col., 1986), sistema nervioso autónomo (Toda 1980), glándula suprarrenal (Aunis y García, 1981), túbulo renal (Bertorello y Aperia, 1989), membrana eritrocitaria (Braquet y col., 1986), músculo liso (Asher y col., 1987; Eggermont y col., 1988) y músculo estriado (Hansen y Clausen, 1988).

La molécula de ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -dependiente es dimérica con un Peso molecular de 280.000 Da (Schwartz y Adams, 1980). Cada monómero está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Aunque el mecanismo de activación de esta ATPasa no se conoce todavía muy bien, lo primero que se produce es la fosforilación de la enzima, modulada por los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$ , por cesión de fosfato desde el ATP al grupo  $\beta$  carboxilo de la ATPasa en presencia de

$Mg^{2+}$  y  $Na^+$  (Cantley, 1986). A continuación, se produce la desfosforilación dependiente de  $K^+$  dando lugar a la formación de P inorgánico. El enzima sufre en este proceso cambios conformacionales dando lugar a la liberación de  $Na^+$  al exterior, siendo la estequiometría del cambio de 3  $Na^+$  por 2  $K^+$  (Friedman, 1982; Vassalle, 1987; Blaustein, 1988)

El intercambio  $Na^+ / Ca^{2+}$ , es un mecanismo alternativo en la membrana plasmática a través del cual el exceso de  $Ca^{2+}$  intracelular es conducido hacia el exterior de la célula contra un gradiente de  $Ca^{2+}$  (Callewaert, 1989; Bridge y col., 1990; Crespo y col., 1990). Este intercambio no sólo puede contribuir a la salida de  $Ca^{2+}$  intracelular, sino también a la entrada de  $Ca^{2+}$ , como ocurre en ciertas enfermedades cardiovasculares, especialmente la hipertensión (Blaustein y col., 1987).

### **3.- MODULADORES DE LOS MOVIMIENTOS DE $Ca^{2+}$**

#### **3.1.- Antagonistas de $Ca^{2+}$**

Los bloqueantes de la entrada de  $Ca^{2+}$  o antagonistas de  $Ca^{2+}$  han sido objeto de interés farmacológico, fisiológico y cardiológico desde finales de los años 60, cuando Fleckstein y sus colaboradores observaron que el verapamil y prenilamina originaban efectos inhibitorios en el miocardio, al interferir con el acoplamiento excitación-contracción, pudiendo ser estos efectos suprimidos, al menos en parte, por la administración de  $Ca^{2+}$  (Fleckenstein, 1970) .

Simultáneamente otro grupo de trabajo, dirigido por Godfraind (1969), mostró que la cinarizina y otras difenilpiperazinas, inhibían las contracciones originadas por despolarización de la membrana en aorta de rata, siendo esta inhibición antagonizada por la administración de  $Ca^{2+}$  extracelular.



Los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  han sido clasificados de distintas formas en virtud de la heterogeneidad química de su estructura, efectos farmacológicos y aplicaciones clínicas. Así, Fleckenstein (1985) subdividió a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  en dos grupos:

Grupo A, constituido por aquellos compuestos que presentaban alta selectividad para inhibir la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dentro de este grupo se incluyen el verapamil, diltiazem y las dihidropiridinas.

Grupo B, formado por compuestos con menor selectividad para inhibir la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , pudiendo inhibir otras corrientes como la de  $\text{Na}^{+}$ . Pertenecen a este grupo los compuestos como prenilamina, fendilina y perhexilina.

Glossman y col. (1982) dividieron los bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en tres grupos en función del lugar al que se fijan en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ : uno representado por las dihidropiridinas, otro, por el verapamil y un tercero por el diltiazem.

Spedding (1984), en base a la liposolubilidad de las moléculas (de mayor a menor), estableció tres grupos para los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ : 1º) Representado por el grupo de las dihidropiridinas. 2º) Formado por el verapamil y diltiazem. 3º) Constituido por difenilalquilaminas.

Otras clasificaciones fueron realizadas por Rodenkirchen (1982) y Murphy (1983), pero fue Godfraind (1987) quien ha hecho una clasificación más completa, al incluir todos los moduladores de  $\text{Ca}^{2+}$ , es decir, todas aquellas moléculas que afectan a los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto antagonistas como agonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ . En esta clasificación se define como antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  o bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , a todos aquellos compuestos capaces de bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular producida por varios estímulos.

### 3.2.- Clasificación de los moduladores de los movimientos de $\text{Ca}^{2+}$ según Godfraind (1987)

#### 3.2.1.- Antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$ que actúan en la membrana plasmática

##### **Grupo 1: Selectivos**

###### *1.1. Bloqueantes de los canales lentos*

- Fenilalquilaminas: Verapamil, Gallopamil (D600), Desmetoxiverapamil (D 888), Emopamil, Falipamil, Vanipamil, Anipamil.
- Dihidropiridinas : Nifedipina, Nimodipina, Nisoldipina, Nitrendipina, Nicardipina, Niludipina, Riosidina, Felodipina, Amlodipina, Azodipina, Dazodipina, Flordipina, Isrodipina, Iodipina, Isradipina, Riodipina, Oxodipina.
- Benzotiazepinas : Diltiazem.

###### *1.2. Agentes sin acción detectable en el canal lento de $\text{Ca}^{2+}$ del miocardio.*

- Difenilpiperazinas : Cinarizina y Flunarizina.

##### **Grupo 2 : No Selectivos**

###### *2.1. Agentes que actúan sobre canales de calcio y sodio*

- Bepridil, Fendilina, Lidoflacina, Perhexilina, Prenilamina, Teorilina, Tiapamil, Proadifen (SKF 525 A), Eafenona, Benciclame, Caroverine.

## *2.2. Agentes que poseen otro lugar primordial de acción.*

- Anestésicos locales: Fenitoína.
- Agonistas y Antagonistas del sistema nervioso adrenérgico: Fenoxibenzamina, Benextramina, Nicergolina, Pimocide, Propanolol, derivados de la Yohimbina, WB 4101.
- Benzodiacepinas: Diazepam, Flurazepam.
- Agonistas y Antagonistas opiáceos: Loperamina, Fluperamina.
- Agentes que actúan sobre nucleótidos cíclicos: Amrinona, Papaverina, Cromoglicato.
- Barbitúricos.
- Ciproheptadina.
- Indometacina.
- Reserpina.

## *2.3. Antagonistas inorgánicos del $\text{Ca}^{2+}$ .*

- Cationes polivalentes:  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ .

### **3.2.2.- Facilitadores de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$**

#### **3.2.2.1.- Agentes que actúan en la membrana plasmática "agonistas del calcio".**

- Dihidropiridinas: BAY K 8644, CGP 28392, YC-170.

#### **3.2.2.2.- Agentes que actúan sobre el retículo sarcoplásmico**

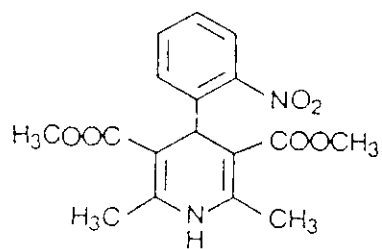
- Inositol- 1,4,5, trifostato ( $\text{IP}_3$ ).

- Cafeína.

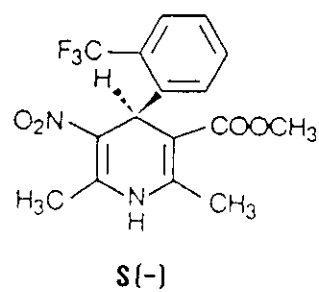
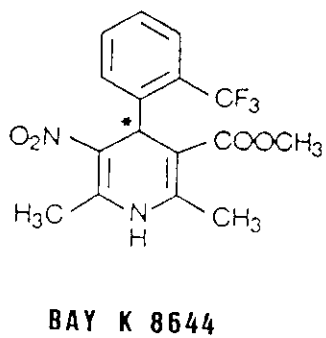
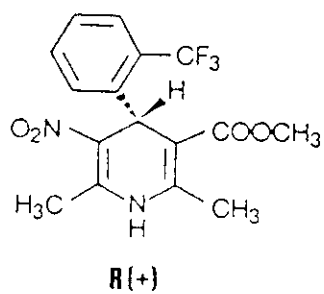
### **3.2.2.3.- Ionóforos**

- A 23187.
- Ionomicina.

La nifedipina [1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil) piridina-3-5-dicarboxilato dimetilo], antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado en este trabajo, es el prototipo de las dihidropiridinas. Fue sintetizada por los laboratorios Bayer con el nombre inicial de Bay A 1040 y caracterizada como potente antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  por Fleckenstein y col. (1970) (Fig. 4). La relación estructura-actividad de este compuesto, junto con el resto de las dihidropiridinas, ha sido ampliamente estudiado (Rosenberger y Triggle, 1978; Mannhold y col., 1982; Rodenkirchen y col., 1982; Janis y Triggle, 1984). Para que estos compuestos se comporten como antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental que posean los siguientes grupos: estructura dihidropiridínica, un N secundario y un sustituyente voluminoso en la posición 4 del heterociclo.



**NIFEDIPINA**



**Fig. 4.** Estructura química de la nifedipina y del BAY K 8644 con sus enantiómero R (+) y S (-).

### **3.3.- Mecanismo de acción de los antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$**

Se ha demostrado por estudios electrofisiológicos que el principal sitio de acción de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , está situado en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana celular (Triggle y Janis, 1989).

Como se ha comentado anteriormente, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden existir en tres estados, de manera que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  dihidropiridínicos tendrían alta afinidad por el modo inactivado del canal (Janis y Triggle, 1989; Godfraind y col., 1990). Las dihidropiridinas disminuyen la probabilidad de que el canal esté abierto, pero no afectan a su tiempo de apertura (Hess y col., 1984), mientras que el D 600 (diltiazem) reduce el tiempo de apertura cuando el canal está abierto (Cavalie y col., 1985).

Los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  bloquean principalmente los canales tipo L, pero no por una simple obturación del canal, sino que actúan favoreciendo que el canal permanezca cerrado, inhibiendo el paso de corriente a su través (Lew y col., 1991; Worley y col., 1991). Presentan una alta afinidad por la subunidad  $\alpha_1$  de estos canales (Tanabe y col., 1987).

Mediante técnicas de fijación de radioligandos, se ha podido comprobar la presencia de receptores específicos para los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  en varios tejidos. Estudios iniciales con [ $^3\text{H}$ ]-nitrendipina, comprobaron que la unión de ésta a membranas de músculo liso (Bolger y col, 1983; Janis y col., 1985) y músculo cardíaco (Sarmiento y col., 1984) era específica, saturable, rápida, reversible y estereoselectiva. Algunos autores sugieren que este receptor para dihidropiridinas en

músculo liso y esquelético está localizado extracelularmente en la membrana plasmática dentro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Strübing y col., 1993). Además, la inhibición de la unión del radioligando por otras dihidropiridinas mostró una correlación con la inhibición de la contracción. Estos experimentos sugirieron, la existencia de un receptor específico en los CVD, al cual se unirían las dihidropiridinas y como consecuencia de la unión darían lugar a sus efectos (Kevin y col., 1988). Estos sitios de unión de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  no sólo están presentes en músculo liso y cardíaco, en donde estos compuestos mostrarán su mayor efecto terapéutico, sino también están presentes en músculo esquelético, células endocrinas y sistema nervioso. La mayor densidad de sitios de unión de las dihidropiridinas se encuentra en los túbulos T del músculo esquelético, de donde se ha purificado el receptor dihidropiridínico (Tanabe col., 1987).

Por otra parte, se ha comprobado que altas concentraciones de verapamil, inhiben de un 30 al 40 % la fijación de la [ $^3\text{H}$ ]-nitrendipina, lo que indica que el verapamil, influye en la unión de [ $^3\text{H}$ ]- nitrendipina sólo de manera indirecta, lo que hace suponer que actúa sobre un receptor distinto al dihidropiridínico, pero unido de manera alostérica a este último (Ehlert y col., 1982; Glossman y col., 1982). Por el contrario, cuando el diltiazem se une a su receptor, se incrementa en un 40 al 50 % la fijación de la [ $^3\text{H}$ ]-nitrendipina a su receptor (Ferri y col., 1982; Yamamura y col., 1982).

Además, se ha puesto de manifiesto, que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  también interaccionan con otras estructuras celulares. Así, se ha localizado un sitio de unión para las fenilalquilaminas en el retículo sarcoplásmico y dos sitios de unión, uno para nitrendipina y otro para sustancias de naturaleza benzodiazepínica en la mitocondria (Zerning, 1990).

El mecanismo del bloqueo de las respuestas contráctiles inducidas por el acoplamiento de un agonista a su receptor por medio de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$

muestra resultados un poco discrepantes. Así, según Miller y Freedman (1984) los procesos que involucran la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los lugares intracelulares son insensibles a estos fármacos. Sin embargo, ciertos antagonistas pueden bloquear los efectos de NA en algunos lechos vasculares por una acción sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Janis y Triggle, 1984; Miller y Freedman, 1984; Kuroda y col., 1991; Oriowo y Ruffolo, 1992). Estudios microfluorométricos, usando Quin 2 (Kanaide y col., 1988), demostraron que el diltiazem y verapamil pueden inhibir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por activación de los adrenoceptores en células de músculo liso vascular. Otros autores apuntan la posibilidad de una mayor sensibilidad de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  para inhibir la contracción mediada por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, que es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, que la obtenida por la estimulación de receptores  $\alpha_1$ , la cual es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Van Meel y col., 1981; Cavero y Spedding, 1983; Müller-Schweimtzer, 1983 ).

#### **3.4.- Acciones vasculares de los antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$ .**

Varios son los factores que influyen para que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  tengan mayor afinidad por unos lechos vasculares que por otros, entre los cuales se encuentran las diferentes propiedades fisicoquímicas de las moléculas (estructura química, solubilidad lipídica, etc.). Por lo que, hay que tener en cuenta: 1º) Concentración de fármaco alcanzada en el lecho vascular. 2º) Mecanismos a través de los cuales en los vasos son activados los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (despolarización o activación de receptores). 3º) Diferencias dependientes del tipo de lecho vascular y de las características de los CVD tales como, su estado de activación, distribución y tipo en cada lecho vascular. 4º) Diferencias en el grado de afinidad de la unión de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  a sus receptores en el CVD en función del tejido, en donde influyen la frecuencia de activación del canal, potencial de membrana y patología del tejido (Cauvin y col., 1987; Wood y col., 1989; Spedding, 1990).

Anteriormente se comentó que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan mayor



afinidad por los CVD tipo L, de manera que cuando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se efectúa a través de los mismos será muy sensible a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, cuando esta entrada se efectúe por otro mecanismo distinto, la sensibilidad a estos agentes se reducirá. De esta manera, en arterias coronarias, cerebrales y en vasos de resistencia periférica en las que tanto las contracciones originadas por la despolarización de la membrana como por la acción de agonistas son muy dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, también serán muy sensibles a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nayler, 1988).

De todos los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , los de naturaleza dihidropiridínica son más selectivos para el músculo liso vascular que para el músculo cardíaco. Esto podría explicarse por la existencia de una mayor proporción de canales tipo L. Dentro de este grupo la nisoldipina tiene mayor afinidad por vasos los coronarios (Godfraind, 1987; Godfraind y col., 1992), la nimodipina y nicardipina por los vasos cerebrales (Kazda y col., 1983; McCalden, 1944; Scribani y col., 1984; Allen, 1985; y McCarthy y col., 1992). Por el contrario, los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  pertenecientes a las fenilalquilaminas (verapamil, galopamil, anipamil y fendilina), así como benzotiazepinas (diltiazem) son más selectivos sobre el miocardio (Mecca y Love, 1992; Schreibmayer y col., 1992).

### **3.5.- Aplicaciones clínicas de los antagonistas de $\text{Ca}^{2+}$**

Los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una gran selectividad tisular sobre el sistema cardiovascular, hecho que reduce los efectos indeseables sobre otros tejidos. Las aplicaciones clínicas de estos compuestos son (Marín, 1988; Nayler 1988, Tamargo y Delpon, 1992):

3.6.1. *Isquemia miocárdica.* El efecto de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el músculo cardíaco se debe fundamentalmente al ahorro de energía que originan junto con el efecto vasodilatador coronario, la inhibición de la agregación plaquetaria y

el enlentecimiento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

3.6.2. *Angina de pecho*. Los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen un tratamiento eficaz en la angina de pecho, independientemente de que se trate de una angina Prinzmetal, de esfuerzo o inestable.

3.6.3. *Arritmias*. Especialmente usados en taquicardias supraventriculares y arritmias provocadas por la isquemia-reperusión. El mecanismo de acción de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  es indirecto, al permitir que funcione con normalidad la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente y no se acumule un exceso de  $\text{K}^+$ .

3.6.4. *Isquemia cerebral*. La nimodipina y nitrendipina pueden prevenir el vasoespasma cerebral (Takenaka y Handa, 1979; Kazda y col., 1983; Steen y col., 1983; Brandt y col., 1986; Pandita y col., 1989). Algunos autores han supuesto que la acción de la nimodipina es en parte debida a su acción sobre el metabolismo cerebral (Heffez y Passonneau, 1985) por su facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica).

3.6.5. *Hipertensión*. Los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  son los fármacos más potentes para reducir la hipertensión arterial. El papel hipotensor de estos fármacos es debido a la combinación de varios mecanismos, como son: disminución de flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana, disminución de la respuesta vasoconstrictora a angiotensina II y reducción de las respuestas a la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (Fleckenstein, 1990; Van Zwieten, 1989).

3.6.6. *Insuficiencia cardíaca congestiva*. Las dihidropiridinas son los fármacos más indicadas de estos cuadros. El mecanismo de acción se debe a la vasodilatación originada por la disminución de las resistencias vasculares periféricas, disminución de la sobrecarga cardíaca y mejoría de la función ventricular.

3.6.7. *Miocardopatía hipertrófica*. El verapamil es el antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  de elección. Este mejora la relajación diastólica, mantiene la perfusión coronaria y posiblemente deprime la contractilidad.

### **3.6.- Agonistas de $\text{Ca}^{2+}$**

Pequeñas modificaciones en la estructura del antagonista dihidropiridínico, nifedipina, han llevado al descubrimiento del compuesto BAY K 8644 que incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células. El BAY K 8644 fue el primer agente de este grupo, posteriormente se sintetizaron otros. Dentro de este grupo se encuentran:

- BAY K 8644 (metil-1,4 dihidro-2,6-dimetil-3 nitro-4-(2trifluorometilfenil(piridina-5-carboxilato) (Schramm y col., 1983)
- CGP 23892 [etil-4-(2-difluorometoxifenil)-1,4,5,7-tetrahidro-2 metil-5-oxofuro-(3,4 b) piridina-3-carboxilato] (Truog y col.,1985).
- YC-170 [2-(2-piridil) etil-4-(0-clorofenil-2,6-dimetil-fenilcarbamoil)-1,4 dihidropirina-3 carboxilato] (Takenaka y Maeno, 1982).

En este trabajo de investigación se ha utilizado el BAY K 8644, cuya estructura es similar a la nifedipina, como se puede apreciar en la Fig 4. Al tener un C asimétrico posee dos enantiómeros: uno dextrógiro (+) y otro levógiro (-) o "R" y "S" según la nomenclatura de la I.U.P.A.C. El compuesto S (-) se muestra como un antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el R (+) es un agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  (Franckowiack y col., 1985; Schramm y col., 1986; Vaghy y col., 1987).

El BAY K 8644 posee un efecto ionotrópico (+) a nivel cardíaco y también causa contracción del músculo liso vascular (Schramm, 1983; Salaices y col., 1985;

Fernández Alfonso y col., 1988; Hertle y col., 1989; Rico y col., 1990). Parece ser que el BAY K 8644 produce un aumento de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del CVD (Worley y col., 1991). Así, estudios de "patch clamp" han demostrado que este compuesto favorece aperturas prolongadas de los CVD, aumentando la probabilidad de que estos canales permanezcan abiertos durante el proceso de despolarización (Hess y col., 1984; Kokubun y Reuter, 1984; Triggle y Janis, 1989). Algunos autores han postulado la necesidad de una despolarización moderada previa para que pueda actuar el BAY K 8644, como ocurre en la aorta de conejo (Schramm y col., 1983; Turlapaty, 1979), de rata (Rico y col., 1990), arteria caudal de rata (Su y col., 1984) femoral de gato (Salaices y col., 1985) y mesentérica de conejo (Kanmura y col., 1984). Sin embargo, en otros lechos vasculares como en el cerebral dicha despolarización no es necesaria (Salaices y col., 1985; Fernández Alfonso y col., 1988).

Mediante técnicas de fijación de radioligandos se ha podido comprobar que los agonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , compiten por el mismo receptor dihidropiridínico del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Janis y Triggle., 1984; Skattebol y col., 1989).

#### **4.- PAPEL DEL ENDOTELIO EN LAS RESPUESTAS VASCULARES**

En la década de los 70 se consideraba que las células endoteliales, no representaban más que una capa simple que separaba la sangre de los tejidos y que a nivel capilar permitía el intercambio de nutrientes y productos de deshecho. En la actualidad se ha demostrado que el endotelio de los vasos sanguíneos posee múltiples funciones importantes tales como captación y destrucción enzimática de NA y serotonina circulante, conversión de angiotensina I en el potente vasoconstrictor angiotensina II, participación en el metabolismo de la bradikina, en la síntesis de prostaciclina (Moncada y Vane, 1978; Vanhoutte, 1986, 1988). Sin embargo, es a partir del año 1980 cuando el endotelio adquiere una especial relevancia, al

demostrar Furchgott y Zawadzki el papel obligatorio de las células endoteliales en la vasodilatación inducida por acetilcolina.

Posteriormente se demostró que además de la acetilcolina, son muchos los agentes vasodilatadores cuyo efecto depende de la presencia de endotelio: ATP y ADP (Katusic y col., 1984), sustancia P (Zawadzi y col., 1981), bradikinina (Cherry y col., 1982; Chand y Altura, 1981), trombina (De Mey y Vanhoutte, 1982), productos de la agregación plaquetaria, nucleótidos de adenosina, serotonina, factor agregante plaquetario (Cohen y col., 1984; Houston y col., 1985; Vanhoutte y Houston, 1985) y vasopresina (Cohen y col., 1983 ; Katusic y col., 1984).

Furchgott y Zawadzki (1980) demostraron en la aorta de conejo, que la relajación producida por la acetilcolina se produce por la acción de ésta sobre los receptores muscarínicos de las células endoteliales, estimulando la liberación de un factor que actuaría en las células musculares lisas originando la relajación vascular. A este factor se le denominó EDRF ("endothelium-derived relaxing factor"). Este EDRF, ha sido identificado como NO y tiene una vida media muy corta, aproximadamente de 6 segundos (Palmer y col., 1988). Sin embargo, el EDRF tiene algunas propiedades que no se explican asumiendo que el EDRF es simplemente NO. Así, otros autores apuntan la posibilidad de que se trate de un compuesto R-NO, a partir del cual se produce la liberación de NO (Shikano y col., 1987; Angus y Cocks, 1989). Se ha demostrado que el precursor fisiológico de la formación de NO es el aminoácido L-arginina (Palmer y col., 1988; Rees y col., 1990). Parece ser que un aumento de  $Ca^{2+}$  libre citoplasmático en las células endoteliales, es un paso inicial importante en la síntesis de EDRF (Vanhoutte y col., 1986).

El EDRF provoca la activación de la guanilato ciclasa soluble de las células musculares lisas con el consiguiente aumento de los niveles de GMPc (Rapoport y Murad, 1983; Griffith y col., 1985; Collins y col., 1988). Este aumento de GMPc

provoca una inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células musculares lisas, lo que ocasiona la vasodilatación (Karaki y col., 1984; Collins y col., 1986).

Existen varios agentes que puede antagonizar el efecto o la síntesis de EDRF como: 1º) Azul de metileno, que bloquea la guanilato ciclasa e inhibe la síntesis de GMPc inducida por sustancias como la acetilcolina, el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A 23187 o los nitrovasodilatadores (Grueter y col., 1981; Ignarro y col., 1984; Martin y col., 1985; Shirase y col., 1988b), también puede actuar por sus propiedades redox, generando radicales libres de  $\text{O}_2$  (Moncada y col., 1988). 2º) Oxihemoglobina que bloquea la acción del NO al formar el complejo nitrosil-hemoproteína (Martin y col., 1985). 3º) Sustancias que generan radicales libres que oxidan e inactivan el EDRF (Moncada y col., 1986; Gillespie y Sheng, 1990). 4º) Inhibidores de la síntesis de NO, como el L-NMMA (L-arginina  $\text{N}^G$ - monometil-L-arginina), L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil ester)(Rees y col., 1990),  $\text{N}^G$ - nitro-L-arginina (Kobayashi y Hattori, 1990; Moore y col., 1990) y L-NIO (N-iminoetil-L-ornitina) (Palmer y col., 1988; Rees y col., 1990).

A pesar de que el NO es el principal factor liberado del endotelio se ha comprobado que la acetilcolina, puede originar hiperpolarización en algunos lechos vasculares que no es mimetizada por el NO (Komori y col., 1988 ; Chen y Cheung, 1992), lo que sugiere la capacidad de este agonista para liberar otro factor al que se ha denominado EDHF ("endotelium-derived hyperpolarizing factor") (Komori y Suzuki, 1987 a,b; Feletou y Vanhoutte, 1988). Se han propuesto dos mecanismos de acción distintos para el EDHF: activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente del músculo liso vascular (Feletou y Vanhoutte, 1988) o la apertura de canales de  $\text{K}^+$  con aumento de la conductancia a este ión a través de la membrana de la célula muscular lisa (Chen y col., 1988; Kauser y col., 1989).

Además de la liberación de estos factores relajantes existen evidencias de que

el endotelio puede liberar sustancias que median ciertas respuestas vasoconstrictoras (Vanhoutte y col., 1991; Lüscher y col., 1992; Tanoi y col., 1992). Se han descrito tres factores contráctiles ECDFs "endothelium derived contractile factors":

EDCF<sub>1</sub>. Ha sido identificado como un metabolito del ácido araquidónico, vía ciclooxigenasa (Miller y Vanhoutte, 1985; Vanhoutte, 1987, 1988). Se ha descrito su existencia en distintos lechos vasculares tales como las venas pulmonares, femoral, esplénica y safena de perro (De Mey y Vanhoutte, 1982; Miller y Vanhoutte, 1985), arteria pulmonar de conejo (Altiere y col., 1986) y aorta de ratas espontáneamente hipertensas (Lüscher y col., 1988).

Existen dos posibles compuestos que pueden ser EDCF<sub>1</sub>: un compuesto relacionado con el tromboxano A<sub>2</sub> (Altiere y col., 1986; Shirahase y col., 1987; 1988a) y otro relacionado con compuestos prostaglandínicos de tipo F<sub>2α</sub> y E<sub>2</sub> (Katusic y col., 1988, Rubanyi, 1988a).

EDCF<sub>2</sub>. Es una sustancia de naturaleza polipeptídica aislada y purificada de células de aorta de cerdo (Yanagisawa y col., 1988) denominada endotelina. Este polipéptido es un potente agente vasoconstrictor en distintos lechos vasculares (Kasuya y col., 1989; Stasch y Kazda, 1989; Sánchez-Ferrer y Marín, 1990; Encabo y col., 1992; Tanoi y col., 1992; Haynes y Webb, 1993). Aunque a concentraciones bajas se ha descrito que puede originar vasodilataciones dependientes de endotelio en aorta de rata (Moritoki y col. 1993).

Se han descrito tres genes para la endotelina en el genoma humano, siendo los productos de su expresión endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3) (Inoue y col., 1989; Yanagisawa y Masaki, 1989a,b), que difieren entre sí en algunos aminoácidos; sin embargo, sólo la ET-1 es detectada en las células endoteliales (Masaki y Yanagisawa, 1992).

El mecanismo que regula la producción de cada isotipo de endotelina en distintas células y tejidos aún no está muy claro. La ET-1 se origina a partir de un precursor peptídico constituido por 203 aminoácidos denominado preproendotelina, compuesto que se escinde por endopeptidasas específicas para residuos dibásicos, dando lugar a un péptido con 38 aminoácidos en el caso de la especie humana, denominado proendotelina (Watanabe y col., 1989). Esta proendotelina es convertida en endotelina activa por un enzima convertidor de endotelina (Yanagisawa y Masaki, 1989a,b).

A pesar de que el  $\text{Ca}^{2+}$  exterior es necesario para que la endotelina produzca su efecto, no parece activar directamente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Doherty, 1991). Para producir el efecto la endotelina se une a distintos tipos de receptores de la membrana celular, acoplados a proteínas G, dando lugar a un aumento de  $\text{IP}_3$  y DG con la consiguiente estimulación de la proteincinasa C (Ohlstein y col., 1989).

Existen tres subtipos de receptores para la endotelina demostrados en distintos tejidos de rata: uno en células musculares lisas con alta afinidad para la ET-1 y sarafatoxina-S6b (péptido obtenido de la serpiente *Atractaspis engaddensis*, con una estructura similar a la de la ET-1); otro aislado del cerebelo con preferencia por sarafatoxina-c y con baja afinidad por ET-1 y un tercero en el putamen, que ofrece afinidades similares para todos los péptidos (Kloog y Sokolovsky, 1989).

$\text{EDCF}_3$ . Este factor aún no caracterizado, se ha observado su liberación en el lecho cerebrovascular en situaciones de anoxia (Greenberg y Diecke, 1988; Rubanyi, 1988a).

Estos factores contráctiles podrían estar implicados en los mecanismos de regulación del flujo sanguíneo, así como en situaciones patológicas tales como hipertensión o vasoespismo cerebral (Lüscher, 1990, Sánchez-Ferrer y Marín, 1990; Lüscher y col., 1992). Se puede decir, por tanto, que las células endoteliales podrían



actuar como transductores de distintos estímulos capaces de modificar el tono vascular por la liberación de factores contráctiles o relajantes.

## **5.- FISIOPATOLOGIA DE LA HIPERTENSION**

La hipertensión es un proceso patológico que se caracteriza por un aumento de la resistencia vascular periférica (Nayler, 1988). Debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  parece jugar un papel importante en la contracción del músculo liso vascular se le ha implicado en la patogénesis de la hipertensión esencial (Aoki y col., 1982; Young y col., 1990)

La hipertensión esencial humana tiene como origen un fuerte componente genético (Sing y col., 1986). El aumento de la presión sanguínea en esos pacientes depende en parte de la ingesta de  $\text{Na}^+$  en la dieta. En modelos experimentales de animales hipertensos también se ha confirmado la existencia de un componente genético, asociado a un aumento de presión arterial, pero la heterogeneidad fisiológica entre ellos hace suponer que la hipertensión genética puede estar originada por una o más alteraciones genéticas (Johnson y col., 1992).

Varios factores son los que pueden contribuir a un aumento en la resistencia vascular periférica en la hipertensión (Marín, 1993). Entre ellos están :

- 1- Alteraciones del lecho vascular.
- 2- Alteraciones en la respuesta vascular por:
  - a) Aumento de la actividad simpática externa.
  - b) Aumento en la sensibilidad a NA .
  - c) Alteraciones del metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$ .

- 3- Alteración de la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente de la membrana plasmática.
- 4- Disminución de la actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática y retículo sarcoplásmico.
- 5- Disminución del intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ .
- 6- Aumento de la permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 7- Cambios en la ultraestructura del lecho vascular.

Además de esto, el sistema renina-angiotensina tiene una participación importante en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión como lo demuestra el hecho de la efectividad clínica de los antagonistas del enzima convertidor.

La hipertensión arterial, se puede dividir etiológicamente en tres grupos:

- 1.- Hipertensión esencial genética, con alteración del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana del músculo liso arterial.
- 2.- Hipertensión secundaria a un exceso de sal, sobrepeso, ansiedad ,etc.
- 3.- Hipertensión secundaria originada como consecuencia de un proceso inicial de aldosteronismo, feocromocitoma, hipertiroidismo, etc.

Si hacemos una clasificación de la hipertensión teniendo en cuenta el nivel plasmático de renina, se puede dividir en hipertensión de alta, normal y baja actividad de renina (Abbot, 1988).

### **5.1.- Modelos animales de hipertensión genética**

Los modelos experimentales utilizados para el estudio de la hipertensión son los siguientes:

- Rata SHR (espontáneamente hipertensa de Aiko-Okamoto), junto a su

control normotenso, la rata Wistar-Kyoto (WKY). Es el modelo de rata hipertensa mejor conocido, cuyas alteraciones en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  están estrechamente relacionadas con las observadas en la hipertensión esencial (Young y col.,1990).

- Rata LH (hipertensa de Lyon), derivada de la rata Sprague-Dawley.

- Rata hipertensa Milán y su control normotenso, usadas como complemento de los resultados obtenidos en la cepa SHR.

- Dos subtipos de la cepa SHR han sido descritos recientemente, la stroke-prone SHR (SHRSp), desarrollada a partir de animales con incidencia de hemorragia cerebral y la Obese SHR, que tienen un consumo aumentado de alimentos y en consecuencia un rápido incremento de peso.

- Rata Dahl, sensible a la administración de sal (hipertensa) y resistente a la misma (normotensa), modelo que necesita una ingesta de sal para la expresión de la hipertensión (Young y col.,1990).

Otro modelo reciente de animal de experimentación es la rata transgénica para el gen Ren-2. Este animal es transformado en hipertenso por la introducción del gen de renina de ratón Ren-2 en el interior del genoma de la rata control que es la rata Sprague-Dawley. Estos animales desarrollan rápidamente hipertensión con bajos niveles plasmáticos de renina (Mullins y col.,1990).

## **5.2.- Metabolismo del $\text{Ca}^{2+}$ en la hipertensión**

Tanto en la hipertensión humana como en la de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se han observado alteraciones en el metabolismo de  $\text{Ca}^{2+}$ , caracterizadas por: 1º) Disminución de los niveles plasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  ionizado. 2º) Hipercalciuria. 3º) Aumento de los niveles plasmáticos de la paratormona (PTH).

4º) Aumento de los niveles plasmáticos de calcitonina. 5º) Modificaciones en la síntesis de vitamina D. 6º) Alteraciones en la absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Normalmente la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  depende del balance entre la absorción neta de  $\text{Ca}^{2+}$  por el tracto gastrointestinal y la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condiciones normales el calcio plasmático está comprendido entre 2,2 a 2,6 mmol/l. El 40-46 % del  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático está unido a las proteínas, principalmente a la albúmina; del 6 al 10% está complejado con varios aniones y el 48-50% restante en forma libre (Rouse y Suki, 1990).

En la cepa SHR, la concentración plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es aproximadamente 0,08 mM, menor que en la cepa control WKY (Wright y col., 1980; McCarron y col., 1981; Wright y Rankin, 1982; Stern y col., 1984; Bindels y col., 1987; Bukoski y col., 1989b), lo que hace suponer que existe un aumento en la fracción de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a proteínas. En la hipertensión esencial humana, los datos son más controvertidos probablemente debido a que las causas que la originan son mucho más heterogéneas y es el resultado de muchos factores genéticos asociados a múltiples factores ambientales. Así, Resnick (1986), estudiando la relación de los niveles plasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  ionizado en pacientes con hipertensión esencial, ha llegado a la conclusión de que en la hipertensión con bajo nivel de renina, se observa una disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  ionizado, mientras que la hipertensión con altos niveles de renina está asociada a altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  ionizado plasmático.

Shibata y Ghishan (1991), estudiando el transporte en vesículas preparadas de membranas de duodeno y yeyuno, han comprobado que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  está disminuido en ratas de la cepa SHR antes y después del desarrollo de la hipertensión, lo que indica un defecto genético de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana intestinal de la cepa SHR. Igualmente Blakeborough y col. (1990) comprobaron que la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  por un mecanismo activo está disminuida en ratas de la cepa SHR.

Por otra parte, se ha observado una hiper calciuria en las ratas de la cepa SHR frente a sus controles (McCarron y col., 1981; Lau y col., 1984; McCarron y Morris, 1986). Sin embargo, también ha sido descrita una disminución en la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  (Folsom y col., 1986; Bindels y col., 1987). No obstante hay que tener en cuenta que una excreción urinaria elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  puede reflejar un aumento en su absorción intestinal o una pérdida renal primaria. Algunos investigadores han postulado que una dieta rica en  $\text{Ca}^{2+}$ , produce una disminución en la presión sanguínea, tanto en la hipertensión humana como en ratas hipertensas (McCarron y Morris, 1985; Saito y col., 1989; Lau y col., 1984; Furspan y col., 1989; Pang y col., 1992; Arvola y col., 1993) aunque a este respecto se han descrito resultados contradictorios (Capuccio y col., 1987; Luft y col., 1988). Parece ser que el  $\text{Ca}^{2+}$  de la dieta corrige el defecto generalizado observado en la hipertensión y disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular (Furspan y col., 1989, Pörsti, 1992). En músculo liso vascular este efecto estabilizante de membrana podría disminuir el movimiento iónico a través de la membrana celular y disminuir las contracciones vasculares (McCarron 1985; Pörsti, 1992).

#### **5.2.1.- Regulación hormonal de $\text{Ca}^{2+}$**

El mantenimiento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  sanguínea es la función principal de las hormonas PTH (paratormona), calcitonina y vitamina  $1,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ , jugando un papel importante en el control de la presión sanguínea y mantenimiento de la homeostasis iónica.

La PTH es una hormona de naturaleza peptídica, cuya secreción se estimula en períodos de hipocalcemia por la glándula paratiroides. Su acción muestra tres efectos: 1º) Disminución de la resorción de  $\text{Ca}^{2+}$  por el hueso. 2º) Aumento de la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y disminución de la reabsorción de fosfato por túbulo renales. 3º) Estimulación de la síntesis de vitamina  $1,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ .

En sujetos con hipertensión esencial se ha descrito un aumento de PTH (Gennari y col., 1986; Young y col., 1988; Brickman y col., 1990). También se ha observado un aumento de PTH en ratas de la cepa SHR, presumiblemente como respuesta secundaria a un nivel bajo de  $\text{Ca}^{2+}$  ionizado plasmático (McCarron y col., 1981; Stern y col., 1984; Young y col., 1988; Resnick, 1990). Además, la extirpación de la glándula paratiroides disminuye la presión arterial en ratas genéticamente hipertensas (Berthelot y Gairard, 1980; Pernot y col., 1990; Schleiffer y col., 1991), y el trasplante de esta glándula de la cepa SHR induce el desarrollo de hipertensión en las WKY (Neuser y col., 1991).

Pang y col. (1990) han citado la existencia de una nueva sustancia, denominada factor hipertensivo del paratiroides (PHF), segregado por la glándula paratiroides procedente de otro tipo de células distintas a las que segregan la PTH. Este factor parece actuar: 1º) Directamente estimulando la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tejido vascular. 2º) Aumentando la reactividad vascular a sustancias vasoconstrictoras. 3º) Produciendo hipertensión en animales normotensos.

La calcitonina es secretada durante períodos de hipercalcemia de las células c parafoliculares de la glándula tiroides. No se conoce muy bien como participa en la patogénesis de la hipertensión, pero se ha comprobado que altos niveles de calcitonina preceden al comienzo de la hipertensión (Bindels y col., 1987).

La vitamina  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$  originada a partir de la vitamina D produce un aumento en la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  por las células intestinales. Se han descrito alteraciones en el metabolismo de la vitamina D en varios síndromes hipertensivos. Schedl y col. (1988) encontraron que los niveles de vitamina  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$  podrían ser los mismos, mayores o menores en ratas de la cepa SHR en comparación a sus controles normotensos. Existen receptores para la vitamina  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$  en el

músculo cardíaco, liso y esquelético (Walters y col., 1986; Merke y col., 1987). En músculo liso la vitamina  $1,25 (OH)_2 D_3$  origina: 1º) Aumento directo de la captación de  $Ca^{2+}$  en las células. 2º) Potenciación de las respuestas contráctiles a los agonistas circulantes (Bukoski y col., 1987; Bukoski y col., 1989a).

### **5.2.2.- Papel del $Ca^{2+}$ libre intracelular en el desarrollo de la hipertensión**

Se han descrito perturbaciones en la membrana plasmática y sistemas de segundos mensajeros en modelos experimentales de hipertensión, los cuales originarían un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular con el consiguiente aumento de la contracción.

Mediante el uso de técnicas con quelantes de  $Ca^{2+}$  fluorescentes (Quin 2, Fura 2, Indo 1) y, midiendo la captación de  $^{45}Ca^{2+}$ , se ha observado un aumento de  $[Ca^{2+}]_{int}$  tanto en la hipertensión humana como en la hipertensión experimental.

Esta  $[Ca^{2+}]_{int}$  es el primer responsable de la actividad contráctil del músculo liso vascular, de manera que un aumento de la  $[Ca^{2+}]_{int}$  origina un aumento del tono vascular, elevación de la resistencia periférica y un aumento de la presión sanguínea. Este  $Ca^{2+}$  citoplasmático también está implicado en el crecimiento celular y la hipertrofia vascular, la cual origina a su vez un aumento de la resistencia periférica (Dominiczak y Bohr, 1990). En la hipertensión humana este aumento de  $[Ca^{2+}]_{int}$  se ha descrito en plaquetas (Erne y col., 1984; Lindner y col., 1987) y linfocitos (Oshima y col., 1988) y en la hipertensión experimental, utilizando las cepas SHR y WKY, en plaquetas (Baba y col., 1990; Oshima y col., 1990), linfocitos (Furspan y col., 1989) y músculo liso vascular (Bukoski y col., 1987; Bukoski, 1990; Sugiyama y col., 1990; Jelicks y Gupta, 1990).

Tanto en pacientes con hipertensión esencial como en ratas de la cepa SHR,

se han observado pocos lugares de unión a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de distintos tipos de células, debido probablemente a una disminución en la proporción de proteínas en la misma para fijar iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Postnov y col., 1979; Devynck y col., 1982; Kowarski y col., 1986). Parece ser que esta alteración en la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la membrana plasmática es una característica genética de la cepa SHR, ya que este fenómeno se ha observado en la membrana plasmática de los eritrocitos, hígado, corazón y tejido neuronal de esta cepa hipertensa comparado con sus controles normotensos (Devynck y col., 1983; Bühler y col., 1986; Zemel y Sowers, 1990).

Es interesante recordar la existencia de tres procesos importantes que regulan la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{int}}]$  en el músculo liso vascular: entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular, movilización de los lugares intracelulares de acumulación y la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio intracelular al extracelular (Wuytack y Raeymaekers, 1992; Chen y Van Breemen, 1992).

#### **5.2.2.1- Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ del espacio extracelular**

Se ha comprobado que la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  tanto en situación basal como inducida por agonistas, está aumentada en vasos de ratas de la cepa SHR (Cauvin y col., 1987). Igualmente en células musculares lisas cultivadas de aorta, la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  está aumentada comparada con la obtenida en células de ratas normotensas (Bukoski y col., 1987).

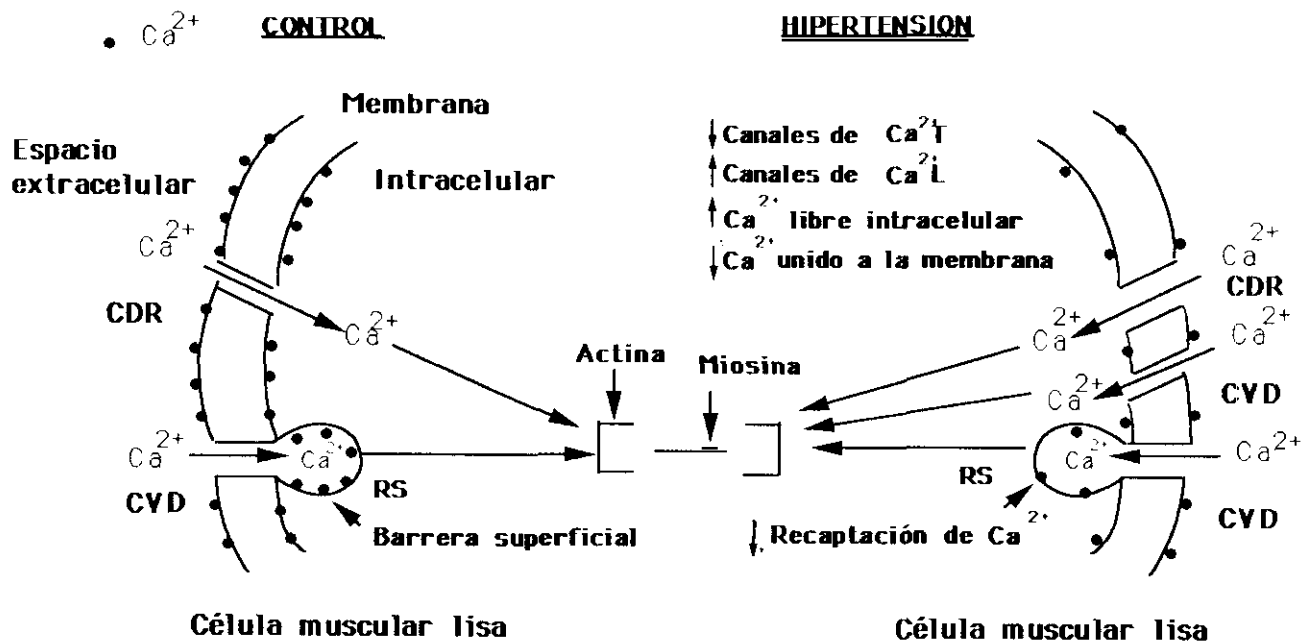
Se han encontrado anormalidades en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular a través de las dos vías más importantes de entrada, los CDR y CVD (Khalil y col., 1990; Wadsworth, 1990). Sin embargo, algunos autores han encontrado sólo anormalidades en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales CDR (Mulvany y Nyborg, 1980; Van Breemen y col., 1987), al comprobar que el aumento de la



entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por NA en arteria caudal o mesentérica era superior en los animales hipertensos y no se modificaba la producida por una solución despolarizante de  $\text{K}^+$  (Aqel y col., 1987). Por el contrario, otros autores indican que la sensibilidad de los CVD también está modificada en la cepa SHR, ya que el BAY K 8644 produce respuestas contráctiles mayores en segmentos de arteria femoral de la cepa SHR en comparación a su control (Aoki y Asano, 1986).

Mediante técnicas de "patch-clamp" se ha comprobado la existencia de dos tipos distintos de CVD en músculo liso de vena azigos, los canales tipo L y los tipo T (Sturek y Hermsmeyer, 1986; Hermsmeyer y Rusch, 1989). En células musculares lisas aisladas de la vena azigos de la cepa SHR, hay una predominancia (62%) de los canales tipo L, mientras que en células aisladas de la cepa WKY, predominan los canales de tipo T (58%) (Rusch y Hermsmeyer, 1988; Hermsmeyer y Rush, 1989; Hermsmeyer, 1991). Este incremento en la relación canales L /canales T en las SHR con respecto a las WKY aparece incluso en animales recién nacidos (Hermsmeyer, 1991). La corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser que es la misma en células musculares lisas de la cepa SHR y en la WKY (Rusch y Hermsmeyer, 1988). Si esto mismo sucediera en el músculo liso arterial, se podría explicar el hecho de que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  tengan una potencia mayor en la cepa SHR, ya que estos compuestos especialmente los de naturaleza dihidropiridínica, presentan mayor afinidad por los canales de tipo L (Wadsworth, 1990).

Las alteraciones más importantes originadas en el proceso fisiopatológico de la hipertensión en relación a los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel celular son: aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{int}}]$  libre, disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  unido a la membrana plasmática, reducción de la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico y mayor predominio de los CVD tipo L frente a los T (Fig. 5).



**Fig.5.-** Representación esquemática de las alteraciones observadas en el proceso fisiopatológico de la hipertensión en relación con los movimientos de  $Ca^{2+}$  en músculo liso vascular (Marín, 1993). CDR: canales dependientes de receptores. CVD: canales voltaje-dependientes. RS: retículo sarcoplásmico.

### 5.2.2.2.- Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Cuando un agonista se une a un receptor específico, la señal es transmitida a través de las proteínas G, produciendo la activación de la fosfolipasa C, enzima que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato formando dos productos que actúan de segundos mensajeros: el  $\text{IP}_3$ , el cual entra en el citosol, originando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y DG que aumenta la afinidad de la proteincinasa C por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Johns y col., 1987; Dominiczak y Bohr, 1990).

El metabolismo de los fosfoinosítoles está aumentado en las membranas de los eritrocitos, plaquetas (Koutouzov y col., 1983 y 1988), músculo liso vascular de la cepa SHR (Uehara y col., 1988; Turla y Webb, 1990) y plaquetas de pacientes hipertensos (Bühler y col., 1986).

El contenido de DG está aumentado en aortas de ratas jóvenes antes de establecerse el proceso hipertensivo, mientras que en ratas viejas procedentes de la cepa SHR, la hidrólisis de los fosfatidilinosítoles es menor que en su cepa control (Heagerty y col., 1986; Okamura y col., 1990), lo cual parece sugerir la existencia de un defecto en el acoplamiento a los receptores del  $\text{IP}_3$  en el retículo sarcoplásmico del músculo liso vascular (Turla y Webb, 1990) a medida que aumenta la edad de las SHR.

La acumulación de DG en el tejido es responsable de la activación de la proteincinasa C, enzima que tiene múltiples sustratos y es un elemento de regulación de distintas funciones celulares, en particular la diferenciación y proliferación celular por expresión del RNA mensajero mediado por el protooncogén c-myc (Armelin y col., 1984; Nishizuka, 1984). Por ello, se puede decir que la proteincinasa C juega un importante papel en el mantenimiento de las contracciones en el músculo liso vascular (Danthuhuri y Deth, 1984; Rasmussen y col., 1984). Se ha demostrado que las arterias de la cepa SHR producen respuestas contráctiles mayores a los

ésteres de forbol, compuestos que activan directamente de la proteincinasa C (Bruschi y col.,1988; Storm y col.,1990).

#### **5.2.2.3.- Actividad de la ATPasa cálcica de la membrana plasmática**

La ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -dependiente presenta baja actividad en la hipertensión, probablemente por un defecto de esta bomba o por activación inadecuada, facilitando la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Webb y Bhalla, 1976; Twietmeyer y col., 1978; Resnick y col., 1986; Vizenci y col., 1986; Postnov y col., 1988).

Se han observado defectos en esta ATPasa en la membrana de las plaquetas de pacientes hipertensos (Resink y col.,1986; Bühler y col., 1986; Zemel y Sowers, 1990) y en eritrocitos de pacientes diabéticos (Zemel y col., 1987).

#### **5.2.2.4.- Actividad de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente en la membrana plasmática.**

Antes del asentamiento de un proceso hipertensivo, el túbulo renal de manera anormal retiene  $\text{Na}^+$  (Bianchi y col., 1975; Mullins y col., 1982), dando lugar a una expansión del volumen sanguíneo (De Wardener y McGregor, 1983), que origina tres fenómenos desde el punto de vista fisiológico:

1. Inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente.
2. Natriuresis.
3. Aumento de la sensibilidad de los vasos sanguíneos a sustancias vasoconstrictoras.

La inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente aumenta la  $[\text{Na}^+]$  intracelular, ya que esta ATPasa origina la salida de 3  $\text{Na}^+$  y entrada de 2  $\text{K}^+$ . Esta

inhibición da lugar a : 1º) Despolarización. 2º) Aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . 3º) Disminución de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del mecanismo de intercambio  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ .

En los procesos hipertensivos se produce la liberación al torrente sanguíneo de una sustancia endógena de naturaleza digitálica liberada quizás del hipotálamo o de células de la glándula adrenal que origina la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -dependiente (Haber y Hauptert, 1987 ; Aviv y Lasher, 1990). La inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  por este factor digitálico da lugar a natriuresis en los túbulos renales, restaurando el volumen del fluido extracelular a su nivel normal.

Aunque la bomba de  $\text{Na}^+$  es la vía más importante de salida de  $\text{Na}^+$  del citoplasma celular, existen otras dos, como son el cotransporte  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  y el intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$  que no modifica la concentración intracelular neta de  $\text{Na}^+$  (Aviv y Lasher, 1990)

El cotransporte  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , se encuentra aumentado en células musculares lisas de ratas de la cepa SHR en comparación con la cepa normotensa incluso en un medio deficiente en  $\text{Ca}^{2+}$  (Tokushige y col., 1986; Shiffman y Bose, 1988).

### **5.2.3.- Regulación del pH intracelular en la hipertensión**

El  $\text{H}^+$  parece tener una especial importancia en el desarrollo de los procesos hipertensivos, al comprobarse que el pH plasmático afecta al tono del músculo vascular de los lechos de resistencia, así como a la regulación de los movimientos de  $\text{Na}^+$  en el riñón. Igualmente se ha observado que el pH es un eslabón en el estímulo del crecimiento celular (Moolenaar y col., 1982; Ponyssegur, 1982).

El principal sistema para mantener el pH celular es el mecanismo de

intercambio  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  sensible a amiloride. Este sistema permite la salida de  $\text{Na}^+$  al medio extracelular y puede estar regulado por agentes mitogénicos y hormonas vasoactivas. Así, en segmentos vasculares de resistencia, la angiotensina II, NA y vasopresina pueden disminuir el pH intracelular (Aalkjaer y Gragoe, 1988; Aalkjaer y Mulvany, 1988).

Otro sistema de mantenimiento del pH intracelular es el sistema de transporte de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  que opera originando la salida de iones  $\text{Cl}^-$  al espacio extracelular y la entrada de iones  $\text{CO}_3\text{H}^-$  (Aalkjaer, 1990).

Se ha comprobado en la hipertensión esencial un aumento del sistema de intercambio  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  en eritrocitos (Canessa y col., 1980; Postnov y col., 1988) y en células musculares lisas cultivadas de ratas SHR frente a sus controles (Kuruyama y col., 1988).

Debido a que el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  es sensible a los cambios en el pH intracelular, es posible que una alteración en la regulación de éste forme parte de los mecanismos involucrados en los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales se encuentran alterados en los procesos hipertensivos (Dahl y col., 1967; De Wardener y McGregor, 1983; Haddy y Pammani, 1985; Aalkjaer, 1990).

#### **5.2.4.- Modificaciones de la reactividad vascular en la hipertensión**

La hipertensión origina cambios variables en las respuestas vasculares a diferentes agentes que dependen de varios factores como el pretratamiento de los vasos, el tipo de vaso y el modelo de animal hipertenso. En la mayoría de los estudios de reactividad vascular, el animal prototipo utilizado es la cepa SHR que se compara con su control WKY.

En hipertensión, en general, se observa una mayor sensibilidad a los

estímulos vasoconstrictores (Lüscher y Vanhoutte, 1986; Lüscher y col., 1988; Shirasaki y col., 1988), mientras que las respuestas vasodilatadoras se encuentran atenuadas. Así, se ha descrito que las respuestas vasoconstrictoras originadas por la NA y el  $K^+$  son mayores en la cepa SHR que WKY (Pang y Sutter, 1981; Holck, 1988; Bolzon y Cheung, 1989). Estos cambios a menudo preceden o son paralelos al desarrollo de la hipertensión, aunque no son el producto de un aumento de la presión sanguínea "per se" (Mulvany y Nyborg, 1980; Konishi y Su, 1983; Winkvist y col., 1984; De Mey y Gray, 1985).

Las relajaciones dependientes de endotelio producidas por vasodilatadores como la acetilcolina, A 23187 e histamina están disminuidas tanto en vasos de resistencia como en arterias de gran diámetro en animales hipertensos en relación a sus controles normotensos. Este hecho ha sido descrito en vasos de modelos de animales con hipertensión genética, renal o inducida por mineralcorticoides. Por otro lado, los vasodilatadores como el nitroprusiato sódico o la adenosina que originan relajaciones independientes de endotelio no modifican su respuesta en los procesos hipertensivos. Esto hace suponer que las alteraciones originadas en el endotelio vascular como consecuencia de la hipertensión, tienen una importancia relevante en las respuestas vasculares inducidas por distintos agentes vasodilatadores (Nakamura y Prewitt., 1991; Shimamura y col., 1991; Yang y col., 1991).

Los antagonistas de  $Ca^{2+}$  como nifedipina, verapamil y diltiazem originan mayores efectos en animales de la cepa SHR (Hulthen y col., 1982; Takata y Hutchinson 1983; Narita y col., 1983), ratas hipertensas renales (Kubo y col., 1981) y ratas DOCA (Arvola y col., 1992) en relación a sus animales controles. En segmentos de aorta o de arteria mesentérica de SHR, la contracción inducida por NA fue más sensible a los efectos inhibidores de nifedipina, nimodipina, nicardipina, diltiazem, verapamil o gallopamil en comparación a sus controles (Kazda y col., 1985; Asano y col., 1988; Atkinson y col., 1988; Boonen y De Mey, 1990).

El BAY K 8644 origina una contracción mayor en segmentos de la arteria femoral de la cepa SHR que en sus controles (Aoki y Asano, 1986), mientras que no se observan cambios en segmentos de arteria aorta, mesentérica y arteria de la cola de la rata (Aqel y col., 1986; Bolzon y Cheung, 1989).

Huang y col. (1987) han aislado un péptido de los eritrocitos de ratas pertenecientes a la cepa SHR. Este péptido aumenta la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los segmentos aórticos, dando lugar a un incremento prolongado de la presión sanguínea cuando es inyectado en animales normotensos (McCumbee y Wright, 1985; McCumbee y col., 1987). Este péptido está también presente en la sangre de animales normotensos, pero a concentraciones significativamente menores que las obtenidas en ratas hipertensas. Se ha observado que este péptido tiene efectos similares al BAY K 8644, y se ha sugerido que puede actuar como modulador endógeno de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **5.3.- Endotelio vascular e hipertensión**

Los vasos de animales con hipertensión experimental sufren cambios morfológicos que afectan a la capa íntima del endotelio y a las células del músculo liso vascular. Las células endoteliales sufren alteraciones en su tamaño, forma y citoplasma (Haudenschild y col., 1979; Majno y col., 1988; Guyton y col., 1990).

Los procesos hipertensivos han sido relacionados con un aumento del recambio de las células endoteliales permitiendo un incremento de la permeabilidad de las moléculas (Wu y Bohr, 1990). Se produce un aumento en la adhesión de monocitos al endotelio, así como una migración de estas células a capas subendoteliales (Chobanian y col., 1989 ; Clozel y col., 1991). En la aterosclerosis experimental, se observan interacciones similares entre las células mononucleares y la pared del vaso (Chobanian y col., 1986). Se ha comprobado experimentalmente que la hipertensión acelera el desarrollo de cambios ateroscleróticos vasculares



(Chobanian y col., 1989), en donde además de migración de monocitos y macrófagos, se produce liberación de factores de crecimiento endoteliales junto a una contribución plaquetaria (Heistad y col., 1991). Los cambios estructurales y bioquímicos sufridos por la íntima y media producen hipertrofia e hiperplasia de las células correspondientes (Haudenschild y col., 1979; Bachmann y col., 1992; Peiró y col., 1992). Shepherd (1990) propuso que estas anomalías en las células endoteliales son causantes del aumento en la resistencia vascular sistémica, que origina un incremento de la presión arterial.

En pacientes hipertensos y en distintos modelos de hipertensión, se ha descrito una disminución en las relajaciones dependientes de endotelio (Lockette y col., 1986; Van de Voorde y Leusen, 1986; Lüscher y Vanhoutte, 1987; Jameson y col., 1990; Panza y col., 1990; Nakamura y col., 1991; Shimamura y col., 1991; Yang y col., 1991) y un aumento en las contracciones inducidas por agonistas (Lüscher y Vanhoutte, 1986; Lüscher y col., 1988; Shirasaki y col. 1988). Algunos autores han descrito que en arterias de la resistencia de la cepa SHR las relajaciones dependientes de endotelio no siempre van a estar disminuídas sino que van a depender del agente vasoconstrictor utilizado (Li y Bukoski, 1993).

La reducción de las relajaciones dependiente de endotelio parece ser secundario a la hipertensión mantenida. Esta reducción se origina como resultado de una producción anormal de EDRF, una difusión alterada a través de la pared anormal del vaso (Van de Voorde y col., 1988) o una respuesta menor del EDRF en el músculo liso vascular (Rau, 1991). Algunos autores han descrito la existencia en la hipertensión de una disminución en la producción de EDRF y GMPc (Otsuka y col., 1988; Shirasaki y col., 1988; Angus y Cooks, 1989; Nakamura y Prewitt, 1991), aunque otros autores (Angus y col. 1988) no han encontrado disminución en la liberación basal del EDRF en la cepa SHR. Este hecho se corrobora con los estudios llevados a cabo por Yamazaki y col. (1991) con L-NMMA, un inhibidor de la síntesis de NO, que origina un efecto hipertensivo mayor en ratas viejas SHR

que en sus controles.

Se ha supuesto que cambios genéticos en la hipertensión pueden generar la formación de factores contráctiles y mitógenos, los cuales aumentan las respuestas vasoconstrictoras y disminuyen la luz del vaso (Lee y col., 1987; Lüscher y col., 1989; Sánchez-Ferrer y Marín, 1990). En pacientes con hipertensión se ha descrito un ligero aumento de los niveles plasmáticos de endotelina 1 (Shichiri y col., 1990), aunque la concentración plasmática estuvo disminuida en la cepa SHR y no modificada en las ratas hipertensas DOCA (Suzuki y col., 1990; Bolger y col., 1991).

#### **5.4.- Disfunciones adrenérgicas en la hipertensión**

En base a estudios realizados en modelos de animales con hipertensión genética, así como en pacientes hipertensos, se han descrito cuatro hipótesis que han puesto de manifiesto el papel importante de la actividad adrenérgica en la patogénesis de las elevaciones de la presión sanguínea de tipo genético:

1.- La actividad simpática está aumentada, tanto en pacientes hipertensos como en distintos modelos de hipertensión (Goldstein, 1983; Westfall y col., 1984), como refleja el aumento de los niveles de NA en el sistema nervioso central y en la liberación de catecolaminas.

2.- La denervación de los nervios simpáticos renales puede prevenir o disminuir el comienzo de la hipertensión (Norman y Dzielak, 1982).

3.- Los agentes simpaticolíticos como el propanolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico no selectivo) pueden prevenir o disminuir la hipertensión (Weissinger, 1984; Borkowski y Quinn, 1985).

4.- La inhibición de síntesis de catecolaminas por tratamiento con un inhibidor de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa puede atenuar el desarrollo de la hipertensión y disminuir la presión sanguínea en animales hipertensos (Ohlstein y col., 1987).

Estudios farmacológicos, fisiológicos y bioquímicos indican que en los procesos hipertensivos, la actividad de los adrenoceptores  $\alpha_1$  postsinápticos está aumentada tanto en ratas hipertensas (Mulvany y Nyborg, 1980; Katovich y col., 1984) como en pacientes hipertensos (Philipp y col., 1978; Iimura y col., 1984), mientras que la actividad de los adrenoceptores  $\beta$  está disminuida. En la hipertensión experimental, este fenómeno está asociado a una reducción en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Michel y col., 1990) y en la producción del segundo mensajero asociado, el AMPc, mientras que el número de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos permanece constante o incluso está aumentado, así como la síntesis de los segundos mensajeros asociados  $IP_3$  y DG (Okamura y col., 1990; De Champlain, 1990). Estas observaciones indican que esta alteración en el balance de las actividades de estos receptores adrenérgicos postsinápticos, promueven los efectos presores del sistema simpático.

Por otra parte, la activación del mecanismo de formación de fosfoinosítoles, produce una acción trófica potente en los miocitos cardíacos y vasculares que junto al predominio del sistema  $\alpha$ -adrenérgico favorece el desarrollo de hipertrofia cardíaca y vascular observada en la hipertensión (De Champlain, 1990).

El aumento del metabolismo de fosfatidilinosítoles puede explicar el incremento de la reactividad vascular a varios agentes vasoconstrictores como NA, angiotensina y vasopresina, permitiendo al estar aumentado el metabolismo de estos compuestos, un incremento en la formación de los segundos mensajeros  $IP_3$  y DG (Mila y col., 1990; Okamura y col., 1990; Turla y Webb, 1990). Por otro lado, la producción crónica de  $IP_3$  podría favorecer un aumento de la  $[Ca^{2+}]_{in}$  libre, dando lugar a una estabilización de la hipereactividad del tejido vascular y cardíaco. Esta situación también puede promover el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión por un aumento de la resistencia periférica y contractilidad cardíaca (Berridge, 1989; De Champlain, 1990).

La producción crónica de DG puede producir un aumento del pH intracelular, activando el intercambio  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ , al ser estimulada la proteincinasa C. Este mecanismo podría favorecer el desarrollo de hiperplasia celular del músculo liso vascular y cardíaco, favoreciendo un aumento de la síntesis de proteínas, de protooncogenes facilitando así el desarrollo de la hipertrofia que aparece en la hipertensión .

#### **5.5.- Sistema renina-angiotensina en la hipertensión**

El sistema renina-angiotensina parece jugar también un papel importante en los procesos hipertensivos debido a su implicación en el control de la presión arterial y el volumen del fluido corporal (Dzau, 1989; Ferrario, 1990; Thind, 1990; Admiraal y col., 1990).

Este sistema está formado por renina, angiotensinógeno, angiotensinas (I y II), enzima convertidor de angiotensina que cataliza la conversión de A I en A II. La liberación de renina, controlada por el aparato yuxtaglomerular renal, inicia una serie de acontecimientos que dan lugar a la formación de A I que se transforma en A II y ésta a su vez en A III, compuesto menos potente que el anterior (Ferrario, 1990; Thind, 1990; Antonaccio y Wright, 1990).

El sistema renina-angiotensina está regulado por distintos factores como la isquemia renal, alteraciones de la presión y volumen sanguíneo, así como por la disminución la concentración sanguínea de  $\text{Na}^+$ . Estos factores facilitan la liberación de renina con la consiguiente formación de A I y A II. La A II es un potente vasoconstrictor que estimula la síntesis y liberación de aldosterona de la glándula adrenal, sustancia capaz de retener iones  $\text{Na}^+$  (Antonaccio, 1982; Antonaccio y Wright, 1990).

El sistema renina-angiotensina parece que no sólo está presente en el riñón,

sino también en tejidos extrarrenales como corazón, glándulas adrenales, cerebro y vasos (Corvol y col., 1989; Dzau, 1989; Ferrario, 1990; Antonaccio y Wright, 1990). En los vasos presenta una localización adventiciomedial, pudiendo tener un papel importante en la regulación de la función simpática. Además, la A II estimula el crecimiento y proliferación celular vascular y cardíaca, dando lugar a hipertrofia e hiperplasia (Dzau, 1989; Ferrario, 1990; Antonaccio y Wright, 1990).

El enzima convertidor parece estar involucrado en el tono vascular dependiente de endotelio (Levy y col., 1990). Los inhibidores del sistema renina-angiotensina han sido utilizados en el tratamiento de la hipertensión, ya que disminuyen la presión arterial tanto en personas normotensas como hipertensas (Brodgen col., 1988; Thind, 1990; Antonaccio y Wright, 1990). El mecanismo de acción de estos compuestos parece ser que no está sólo relacionado con el nivel de actividad basal de renina plasmática, sino con acciones a nivel tisular y en los centros nerviosos simpáticos con disminución de su actividad dando lugar a una reducción de la síntesis local de A II (Becker y col., 1989; Unger y Gohlke, 1990; Ferrario, 1990; Antonaccio y Wright, 1990; Bottari y col., 1993).

## **6.- CAMBIOS CARDIOVASCULARES ASOCIADOS CON LA EDAD**

La edad esta asociada a cambios marcados en el sistema cardiovascular, especialmente en la estructura y función de las arterias. La pared arterial acumula colágeno, lípidos y minerales (Masero y col., 1981), dando lugar a una disminución de su elasticidad. Este aumento de rigidez vascular origina un aumento de la presión sistólica a lo que probablemente también contribuye la disminución de la sensibilidad de los barorreceptores (Julius, 1988). Jackson (1989) postuló que un defecto en el sistema cardiovascular originado por una reducción de las prostaglandinas endógenas, podría contribuir a un empeoramiento de la hipertensión y a complicaciones cardiovasculares a medida que aumenta la edad del individuo.

En animales de laboratorio, las vasoconstricciones inducidas por NA disminuyen con la edad (Docherty, 1986; Fleisch, 1980; Vanhoutte, 1988; Murohara y col., 1990). Se ha observado una disminución en la sensibilidad y en la contracción máxima debido a una reducción del número de receptores adrenérgicos de reserva (Wanstall y O'Donnell, 1988). Otras respuestas contráctiles mediadas por receptores, muestran pequeños cambios o no modificación con la edad (Fleisch, 1980; Vanhoutte, 1988; Wanstall y O'Donnell 1989). Las relajaciones independientes de endotelio también están disminuidas con la edad (Fleisch, 1980; Tsujimoto y col., 1986; Toda y col., 1987; Hongo y col., 1988; Mayhan y col., 1990). Sin embargo, el efecto de las respuestas relajadoras mediadas por el endotelio varían con la especie y el lecho vascular (Vanhoutte, 1988; Hynes y Duckles, 1987). Así, mientras algunos autores han demostrado que las relajaciones dependientes de endotelio mediadas por receptores muscarínicos, disminuyen progresivamente con la edad (Konishi y col., 1983; Shimizu y Toda, 1986; Toda y col., 1987), otros muestran que éstas se incrementan en animales viejos (Hynes, 1987; Dohi y col., 1990). Por el contrario, las contracciones dependientes de endotelio mediadas por receptores muscarínicos están aumentadas tanto en ratas normotensas como hipertensas viejas, debido a la liberación de productos de las células endoteliales por la vía de la ciclooxygenasa (Koga y col., 1988, 1989).

En las ratas viejas, el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en los lugares intracelulares tiene especial importancia en las contracciones inducidas por NA (Carrier y col., 1979). La sensibilidad al efecto depresor de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , es probablemente alta debido a una disminución en la reserva de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, (Wanstall y O'Donnell, 1988; Holck, 1988; Kojima y col., 1989), hecho que ha favorecido el tratamiento de la hipertensión en pacientes de edad avanzada con fármacos bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wei, 1989; Calvo-Gómez y col., 1992). Sin embargo, cuando se estudió el efecto del diltiazem en segmentos contraídos con 5-HT o altas concentraciones de  $\text{K}^{+}$ , no se incrementó a medida que aumentaba la edad del animal, lo que hace suponer que la edad también puede causar una

disminución en la potencia de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , posiblemente por una disminución de la afinidad de estos fármacos a sus sitios de unión en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wanstall y O'Donnell, 1989).

Por otra parte, las respuestas contráctiles inducidas por  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl Ca}_2$  o BAY K 8644, están disminuidas en aortas de ratas viejas (Wadsworth, 1990). Además, el BAY K 8644 sólo es capaz de originar contracción en aortas de ratas viejas, cuando se ha producido una despolarización parcial de éstas (Wanstall y O'Donnell, 1989). En otros vasos, la respuesta de este agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  no varía con la edad (Sakai y col., 1992). Estos dos hechos demuestran que el potencial de membrana en estado de reposo en la aorta puede ser más negativo en preparaciones de ratas viejas. De esta manera, las respuestas vasculares en la aorta de rata a fármacos vasoactivos (contráctiles o relajantes), que actúan a través de mecanismos mediados por activación de CVD o CDR, pueden ser dependientes de la edad.

## ***OBJETIVOS***

---



Para que el proceso de contracción tenga lugar en el músculo liso vascular, es necesario que exista un aumento de  $[Ca^{2+}]_{int}$ . Este aumento de  $[Ca^{2+}]_{int}$  se produce por distintas vías, dependiendo del lecho vascular y del agente vasoconstrictor utilizado .

Cuando la contracción del músculo liso vascular se origina mediante despolarización con  $K^+$ , se ha postulado que la entrada de  $Ca^{2+}$  del espacio extracelular se efectúa a través de los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependiente (CVD) (Hurwitz, 1986), mientras que en la respuesta producida por la NA esta entrada se realiza, principalmente a través de los canales dependientes de receptores (CDR) (Khalil, 1987). Se ha de indicar que algunos autores han sugerido la posibilidad de que la apertura de estos últimos canales estaría asociada en una segunda fase a la apertura de canales voltaje-dependientes, a través de los cuales se produciría la entrada de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular (Nelson y col., 1990). Asimismo se ha descrito que el efecto vasoconstrictor de la NA, produce además la liberación de  $Ca^{2+}$  secuestrado en los depósitos intracelulares, que participa en la contracción inducida por este agonista (Berridge, 1989; Abdel-Latif, 1986; Rasmussen, 1986; Chiu y col., 1987; Marín, 1988; Abkar y col., 1989).

El objetivo de este trabajo es analizar la influencia de la edad, la hipertensión y el endotelio sobre las respuestas vasculares inducidas por dos moduladores de la entrada de  $Ca^{2+}$ , nifedipina y BAY K 8644, que la inhibe y la favorece respectivamente. Para ello se se ha utilizado la arteria aorta con y sin endotelio de ratas procedentes de las cepas SHR y WKY de animales de diferentes edades (5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años). Se optó por la utilización de la cepa SHR y su control WKY por ser uno de los modelos de hipertensión genética más utilizado en la experimentación animal.

Los objetivos concretos fueron analizar la influencia de la hipertensión, la edad y el endotelio sobre:

1.- La respuesta vasodilatadora inducida por nifedipina en segmentos aórticos procedentes de las cepas SHR y WKY precontraídos con NA  $10^{-7}$  M o  $K^{+}$  50 mM.

2.- La respuesta vasoconstrictora inducida por BAY K 8644 en segmentos aórticos, en situación basal y después de una despolarización parcial con  $K^{+}$  15 mM, procedentes de las cepas SHR y WKY.

## **MATERIAL Y METODOS**

---

En la realización de este trabajo, se han empleado como animales de experimentación, ratas de ambos sexos pertenecientes a dos cepas, *SHR* (ratas espontáneamente hipertensas de Aiko-Okamoto) y *WKY* (Wistar-Kyoto), utilizada como control de las anteriores. La cepa *SHR* es el modelo de hipertensión genética mejor conocido.

El peso de los animales fue variable, ya que el estudio se realizó a distintas edades, utilizándose animales de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años, los cuales han sido suministrados por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Las ratas se sacrificaron mediante inhalación de éter etílico y posterior sangría por sección de la carótida. A continuación, se disecó cuidadosamente la aorta, tanto su porción torácica como abdominal, y posteriormente se seccionó en segmentos de 4 mm de longitud en una cápsula de Petri que contenía una solución Krebs-Henseleit (*K-H*) a 4<sup>o</sup> C, y se eliminaron los posibles restos hemáticos y la grasa adherida a los vasos.

Estos segmentos arteriales permanecieron en esta solución hasta su utilización en el mismo día o el día siguiente, después de haberse comprobado que su respuesta vascular no sufría modificación alguna en su reactividad vascular frente a una solución despolarizante de ClK 75 mM.

La composición del *K-H*, expresada en concentración mM, fue la siguiente:

- ClNa .....115
- ClK .....4,6

- $\text{Cl}_2 \text{ Ca}$  .....2,5
- $\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$  .....1,2
- $\text{SO}_4 \text{ Mg.7 H}_2 \text{ O}$  ..... 1,2
- $\text{C0}_3 \text{ HNa}$  .....2,5
- Glucosa .....1,1
- $\text{EDTA Na}_2$  .....0,01

El  $\text{EDTA Na}_2$  se añadió con el fin de retrasar la oxidación del grupo catecol.

La solución *K-H* se preparó diariamente a partir de soluciones concentradas, excepto la glucosa que se añadió la cantidad necesaria en el momento de la preparación del *K-H*.

### **1.- ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD VASCULAR**

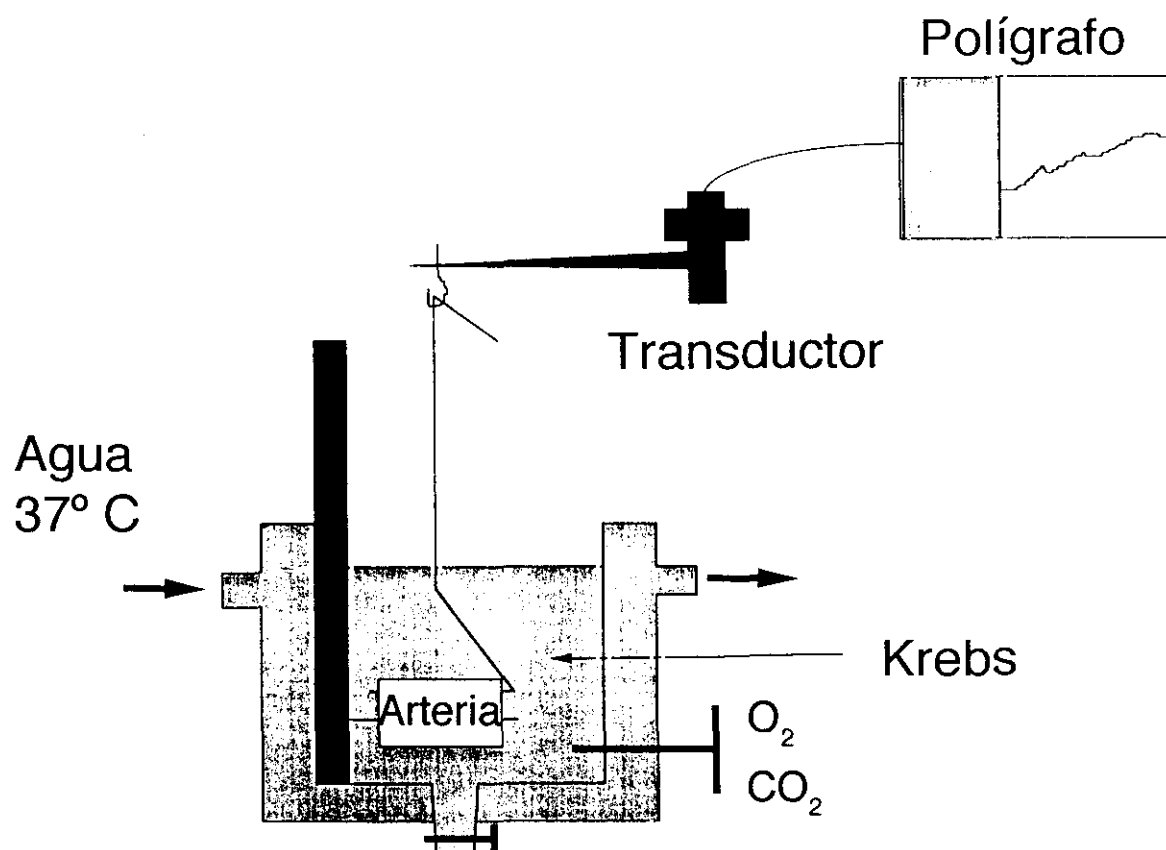
Con el objeto de estudiar la reactividad vascular en estos vasos, se empleó el método descrito por Nielsen y Owman (1971). Para ello, se introdujeron por la luz de los segmentos cilíndricos de aorta de rata dos alambres rígidos de acero (600  $\mu\text{m}$  de diámetro), uno de los cuales estaba fijo a la pared del baño y el otro, que se podía desplazar paralelamente al anterior estaba unido a un transductor de fuerza (Grass FT 3C o Letica TRI011). Este transductor se conectaba a un polígrafo (Grass 7D o Letica 4000) en donde se registraban los cambios de tensión (Fig.6).

Los segmentos arteriales se introdujeron en un baño de órganos que contenía 5 ml de la solución *K-H* a 37°C burbujeada constantemente con carbógeno (95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ ), proporcionando éste al medio un pH entre 7,3 y 7,4. A dichos segmentos se les aplicó una tensión inicial de 1,5 g, que se reajustó periódicamente cada 15 minutos hasta conseguir su estabilización, lo que se consiguió al cabo de unos 90 min.

Posteriormente y para verificar la presencia o ausencia de endotelio vascular, se adicionó al baño NA  $10^{-7}$  M y una vez alcanzado un techo de contracción estable, se adicionó acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$  M. Se consideró que los segmentos tenían endotelio, cuando la contracción residual obtenida en presencia de ACh fue menor del 50% del tono alcanzado por la NA. En aquellas arterias, en las que la contracción residual era mayor del 50% se procedió a la eliminación del endotelio residual. Para ello, se sometieron los segmentos arteriales a la acción de una solución de saponina (0,3 mg/ml *K-H*) (Samata y col., 1986), durante 15 min y después, se comprobó la ausencia de endotelio por el procedimiento anteriormente descrito. Se investigó previamente, que este procedimiento de desendotelización no alteraba las respuestas vasoconstrictoras independientes de endotelio.

En algunos casos, para confirmar la presencia o ausencia de endotelio, se usaron métodos histológicos según la técnica de tinción descrita por Caplan y col., (1974). Para ello, al final del experimento, los segmentos se abrieron longitudinalmente, fijándose a un soporte, de manera que quedara visible su superficie interna. Los segmentos se lavaron en una solución de glucosa al 5% y se sometieron durante 40 seg a una solución de nitrato de plata. Más tarde, se lavaron varias veces con glucosa al 5%, para eliminar el exceso de nitrato de plata, y se revelaron por exposición durante 12 min a luz ultravioleta. La observación de los vasos con un microscopio óptico, mostró un mosaico de células poligonales si las arterias tenían endotelio, debido al depósito de nitrato de plata en las membranas de las células endoteliales.

Después de comprobar la presencia o ausencia de endotelio, se realizaron las correspondientes curvas concentración-respuesta del fármaco a estudiar, no sobrepasando el volumen añadido el 5% del volumen inicial del baño. En cada segmento arterial se realizó una única curva concentración-respuesta a los moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a que sus efectos se mantenían durante largo tiempo.



**Fig.6.-** Esquema de la preparación experimental para el estudio de la contracción isométrica de los segmentos vasculares.

### **1.1.- Estudio de las respuestas al antagonista de $\text{Ca}^{2+}$ nifedipina**

Para estudiar los efectos vasodilatadores de este fármaco en los distintos grupos experimentales, se efectuaron curvas concentración-respuesta en segmentos aórticos previamente contraídos con una solución de  $\text{K}^+$  50 mM o con NA  $10^{-7}$  M con objeto de estudiar el efecto de la nifedipina sobre las respuestas inducidas por activación de los CVD o los CRD, respectivamente.

Las curvas concentración-respuesta a nifedipina se realizaron administrando concentraciones crecientes y acumulativas una vez alcanzado el techo de concentración estable con  $\text{K}^+$  50 mM o NA  $10^{-7}$  M. El intervalo de administración de cada concentración fue de 20 a 25 min.

Las respuestas vasodilatadoras se expresaron en porcentaje de la contracción inducida por el tono previo con NA  $10^{-7}$  M o  $\text{K}^+$  50 mM.

Para profundizar en el estudio del papel del endotelio sobre las respuestas vasodilatadoras de este antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$ , se eligió como grupo experimental a ratas que tuvieran 6 meses de edad, al considerarse que era un grupo de edad intermedio. En cada experimento los segmentos arteriales se dividieron en varios grupos, unos segmentos arteriales se trataron con L-arginina  $10^{-4}$  M, precursor fisiológico del óxido nítrico (Palmer y col. 1988), otros con L-NAME  $10^{-5}$  M ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil-éster), inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (Rees y col., 1990) y otros con L-arginina  $10^{-4}$  M más L-NAME  $10^{-5}$  M, además del correspondiente grupo control. La L-arginina se administró 15 min antes de inducir el tono contráctil con  $\text{K}^+$  50 mM, el L-NAME 25 min antes de la administración de  $\text{K}^+$  50 mM o NA y cuando se utilizaron los dos agentes conjuntamente, primero se administró la L-arginina y 10 min después L-NAME. En todos los casos, después de obtener el techo de contracción con NA o  $\text{K}^+$ , se efectuaron las correspondientes



curvas concentración-respuesta a nifedipina.

### **1.2- Estudio de las respuestas al agonista de $\text{Ca}^{2+}$ BAY K 8644**

Las curvas concentración-respuesta a este fármaco en los distintos grupos de segmentos arteriales se efectuaron de forma creciente y acumulativa en situación basal o con una previa despolarización de la membrana con una solución de  $\text{K}^+$  15 mM. El intervalo de administración de cada concentración de fármaco fue de 20 a 25 min.

Las respuestas contráctiles se expresaron en porcentaje de la contracción previa inducida por una solución de  $\text{K}^+$  75 mM.

### **2.- MEDIDA DE LA PRESION ARTERIAL EN LAS RATAS**

Para analizar si la presión arterial de las ratas era la misma a lo largo de la edad y su variación en función del tipo de cepa, se utilizaron ratas de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de las cepas SHR y WKY.

Los animales se anestesiaron con una solución de pentobarbital (50 mg/Kg peso del animal). Una vez anestesiado el animal, se situó en una mesa en posición decúbito supino. Posteriormente se efectuó una incisión en la zona ventromedial del cuello, procediéndose a separar y cortar la piel dejando visible la arteria carótida. Se pasaron dos hilos por debajo de ésta, ligando la parte distal y dejando iniciado un nudo en la parte proximal para la posterior ligadura de una cánula. Una vez preparada la arteria carótida de esta manera, se cortó la circulación por la parte superior. Se seccionó parcialmente en la arteria carótida, a través de la cual se introdujo una cánula de plástico conectada a un transductor de presión (Viggo-Spectramed), unido éste a un polígrafo (Grass 7 E). A través de una toma lateral, se administró previamente una solución de heparina sódica disuelta en *K-H* (50  $\mu\text{l}$ /50 ml) con el fin de evitar la posterior coagulación sanguínea.

### **3.- FARMACOS EMPLEADOS**

Los fármacos empleados en este trabajo fueron los siguientes:

- Acetilcolina, cloruro de (Sigma)
- L-arginina (Sigma)
- N-nitro-L-arginina metil éster, clorhidrato de (L-NAME) (Sigma)
- BAY K 8644 (Bayer)
- Nifedipina (Bayer)
- Noradrenalina, clorhidrato de (Sigma)
- Saponina (Sigma)

Las soluciones de todos estos fármacos se prepararon cada día a partir de soluciones madre ( $10^{-2}$  M) que estaban en el frigorífico a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El disolvente utilizado para preparar las soluciones madre fue agua destilada, excepto la NA que se preparó en una solución salina (0,9 %) conteniendo ácido ascórbico (0,01 % peso/volumen), para evitar la oxidación del grupo catecol, y la nifedipina y el BAY K 8644 que se disolvieron en etanol (99,5 %). El BAY K 8644 y la nifedipina son sustancias fotosensibles, por lo que fue necesario trabajar con ambos fármacos bajo luz de sodio para evitar su degradación.

### **4.- ANALISIS ESTADISTICO**

Los porcentajes, las medias y los errores estándar se calcularon con el programa Statworks de Appel Computer.

La significancia entre grupos se determinó por el análisis de la t de Student, considerándose significativo el valor de  $p < 0,05$ . Para estudiar la influencia de la cepa, el endotelio y la edad, en las respuestas a los moduladores de la entrada de

$\text{Ca}^{2+}$  se realizó, además, un análisis de la varianza (ANOVA). Considerándose igualmente significativo el valor de  $p < 0,05$ . Para realizar este estudio se utilizó el programa Statview de Apple Computer.

Se realizaron dos tipos de ANOVA, uno de dos factores y el otro de tres. En el análisis de dos factores, uno de ellos fue siempre la concentración del fármaco y el otro fue o bien el estado del vaso (presencia o no de endotelio), la cepa o la edad del animal. En el ANOVA de tres factores los datos de las dos cepas, los correspondientes a las cinco edades y los de los segmentos con y sin endotelio se combinaron y analizaron para cada concentración de fármaco.

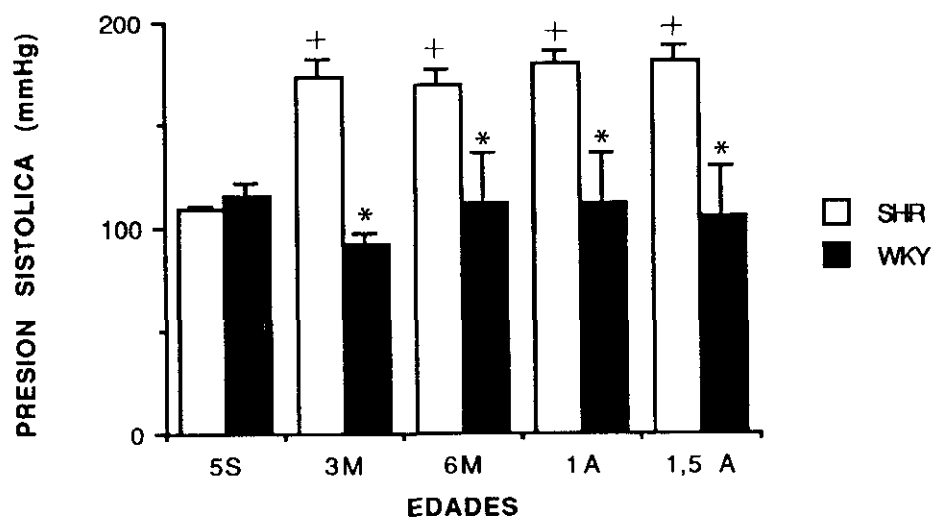
## ***RESULTADOS***

---

## **1.- EVOLUCIÓN DE LA PRESION SANGUINEA**

Antes de efectuar el estudio en las ratas WKY y SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años, se procedió a medir la presión sistólica, con el objeto de comprobar si realmente existían diferencias entre la cepa hipertensa y normotensa. Los datos obtenidos muestran que la presión de las ratas de la cepa SHR de 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años es significativamente superior a las correspondientes de las ratas WKY (Fig. 7).

Para analizar si a medida que aumentaba la edad se modificaba la presión sistólica, en cada una de las cepas y si entre ellas existía una diferencia significativa en función de la edad, se realizó una t de Student. En la cepa SHR se observaron diferencias entre cada una de las edades y la de 5 semanas. Por el contrario, en la cepa WKY sólo se obtuvieron diferencias significativas entre las ratas de 3 meses y 5 semanas (Fig. 7).



**Fig. 7.-** Valores medios de la presión arterial obtenidos en ratas de 5 semanas (S), 3 meses (M), 6 meses, 1 año (A) y 1,5 años de las cepas SHR y WKY. Las barras verticales indican el error estándar para cada valor medio. El número de ratas utilizadas en cada caso estuvo comprendido entre 3 y 5.

\*Representa la significancia entre los valores en la cepa SHR y WKY y + la significancia con respecto al correspondiente grupo de 5 semanas .  $p < 0.05$ .

## **2.- CURVAS CONCENTRACION-RESPUESTA A NIFEDIPINA**

Con el fin de estudiar la influencia de los distintos factores analizados en este trabajo sobre la respuesta vasodilatadora inducida por el antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipina, se realizaron curvas concentración-respuesta a este fármaco en segmentos cilíndricos de aorta, procedentes de ratas WKY o SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años con o sin endotelio, previamente contraídos con  $\text{NA } 10^{-7} \text{ M}$  o  $\text{K}^+ 50 \text{ mM}$ .

Los valores de las contracciones inducidas por  $\text{NA } 10^{-7} \text{ M}$  y  $\text{K}^+ 50 \text{ mM}$ , en los diferentes grupos experimentales se indican en la Tabla 1.

### **2.1.- Influencia de la cepa sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina**

Para analizar si se observaba un comportamiento distinto de la nifedipina en función de que los animales presentaran o no hipertensión, se efectuó un estudio comparativo de los efectos vasodilatadores producidos por este antagonista entre arterias procedentes de ratas de las cepas SHR y WKY.

#### **2.1.1.- Arterias precontraídas con $\text{K}^+ 50 \text{ mM}$**

En segmentos arteriales con o sin endotelio de 5 semanas no se observaron diferencias importantes entre las SHR y WKY (Fig. 8). Cuando se efectuó el análisis de la varianza de dos factores, tampoco se observaron diferencias en función de la pertenencia a una u otra cepa (Tabla 2).

A los 3 meses, los segmentos con endotelio de las ratas SHR presentaban un efecto relajante mayor a nifedipina que los de WKY, existiendo diferencias significativas a concentraciones bajas ( $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  M). Sin embargo, en los segmentos sin endotelio, la relajación fue mayor en las WKY que en SHR a concentraciones altas ( $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M) (Fig. 9). Cuando se realizó el análisis de la varianza de dos factores, no se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora originada por la nifedipina entre la cepa SHR y WKY, probablemente por la dirección opuesta de las variaciones en los segmentos con y sin endotelio cuando se analizó sólo el factor cepa, pero esta diferencia se convirtió en significativa cuando el factor cepa se analizó con la concentración de nifedipina utilizada (Tabla 2).

A los 6 meses el efecto vasodilatador de la nifedipina se incrementó significativamente en los segmentos con endotelio de la cepa SHR a concentraciones  $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M, mientras que en segmentos sin endotelio la relajación fue mayor en las WKY aunque sólo fue significativa a la concentración de  $10^{-9}$  M de nifedipina (Fig. 10). El análisis de la varianza no dio significativo por la misma razón que a los tres meses.

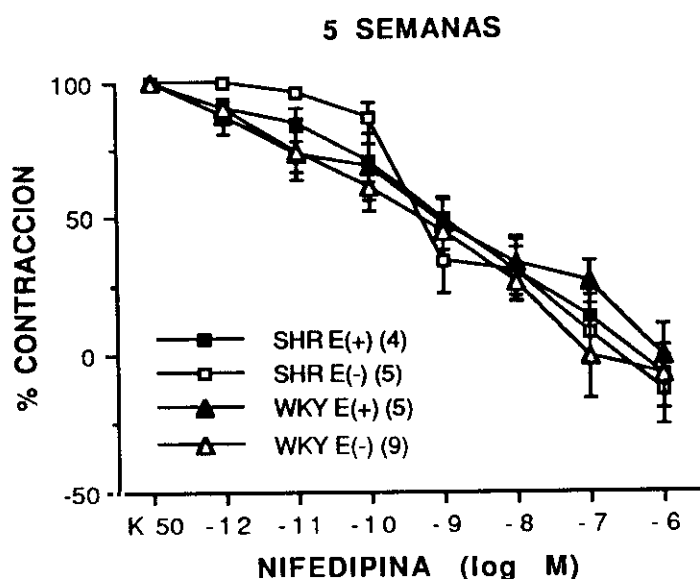
Al año de edad (Fig. 11), el efecto vasodilatador producido por concentraciones altas de nifedipina ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) tanto en segmentos con endotelio como sin endotelio, fue significativamente mayor cuando las ratas pertenecían a la cepa WKY en comparación a las SHR. El análisis de la varianza mostró claramente ( $p = 0,018$ ) las diferencias en función de la cepa estudiada (Tabla 2).

En ratas más viejas (1,5 años) las relajaciones a nifedipina fueron menores en arterias de ratas WKY que en SHR sólo cuando los segmentos presentaban endotelio (Fig. 12). El análisis de la varianza de dos factores, dio como resultado un valor de  $p = 0,001$ , de manera que a esta edad el comportamiento vasodilatador de la nifedipina dependió también del tipo de cepa (Tabla 2).



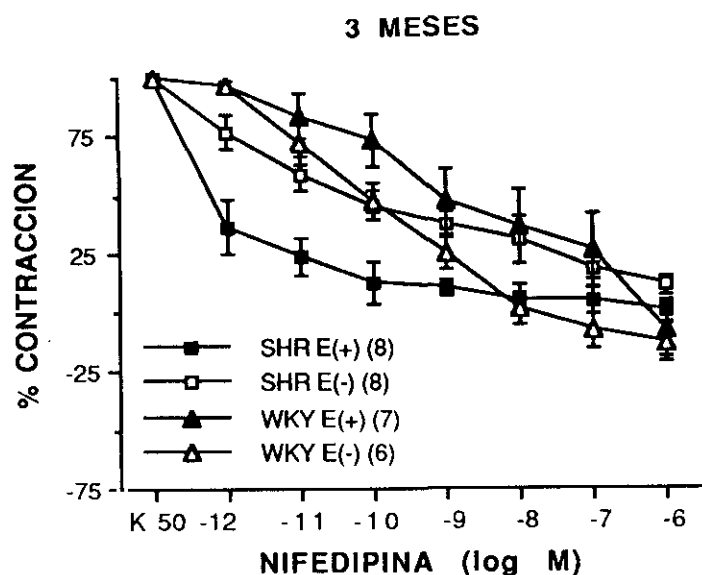
El análisis de la varianza de dos factores, mostró que tanto en los segmentos que presentaban endotelio como en los que carecían de éste, las respuestas vasodilatadoras producidas por la nifedipina eran significativamente distintas entre las SHR y WKY (Tabla 2). Sin embargo, en presencia de endotelio este efecto de la cepa depende de la concentración del fármaco y en ausencia de endotelio no.

De estos resultados obtenidos se puede concluir que el efecto depresor producido por la nifedipina depende de la cepa en segmentos arteriales con o sin endotelio contraídos con  $K^+$  50 mM.



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	90,1 ± 4	100 ± 4	87,1 ± 6	90,8 ± 3
-11	84,4 ± 6	95,8 ± 6	73,0 ± 9	74,1 ± 8
-10	69,9 ± 7	86,5 ± 7	68,5 ± 12	60,5 ± 9
-9	57,2 ± 9	78,3 ± 8	46,8 ± 9	44,5 ± 7
-8	48,8 ± 9	69,1 ± 8	33,1 ± 9	25,8 ± 7
-7	39,6 ± 7	55,5 ± 9	25,8 ± 7	-1,3 ± 14
-6	-7,3 ± 6	-13,0 ± 6	-1,1 ± 4	-7,7 ± 18

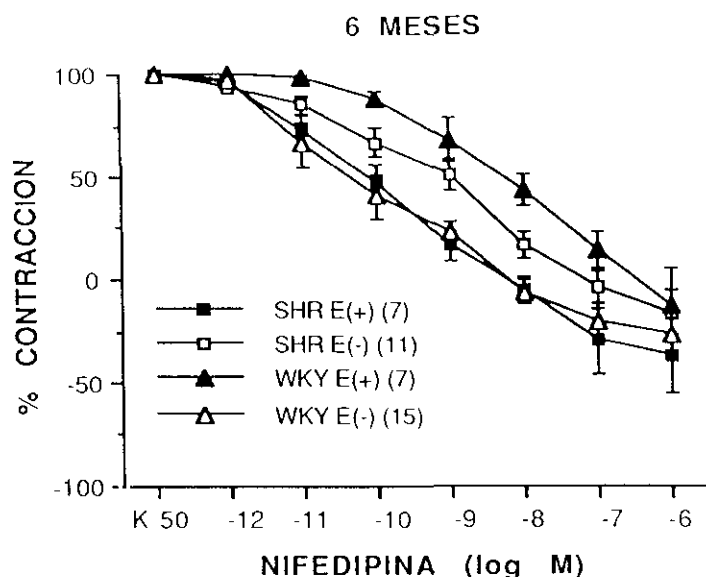
**Fig. 8.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio procedentes de las cepas SHR y WKY de 5 semanas de edad. La nifedipina se administró en concentraciones crecientes y acumulativas, una vez alcanzado un tono de contracción estable con  $K^+$  50 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por  $K^+$  50 mM cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 1. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados.



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	36,5 ± 11	77,0 ± 8	96,1 ± 2 **	96,6 ± 2
-11	23,6 ± 7	58,6 ± 7	83,4 ± 9 **	71,5 ± 8
-10	12,5 ± 9	45,0 ± 6	72,9 ± 11 **	47,0 ± 7
-9	10,0 ± 4	37,5 ± 5	47,5 ± 12 *	25,0 ± 7
-8	5,0 ± 6	30,0 ± 10	35,7 ± 15 *	1,3 ± 7 **
-7	-10,1 ± 11	36,4 ± 10	25,6 ± 15	-8,1 ± 7 *
-6	-7,1 ± 8	12,7 ± 9	-7,3 ± 11	-13,0 ± 7 **

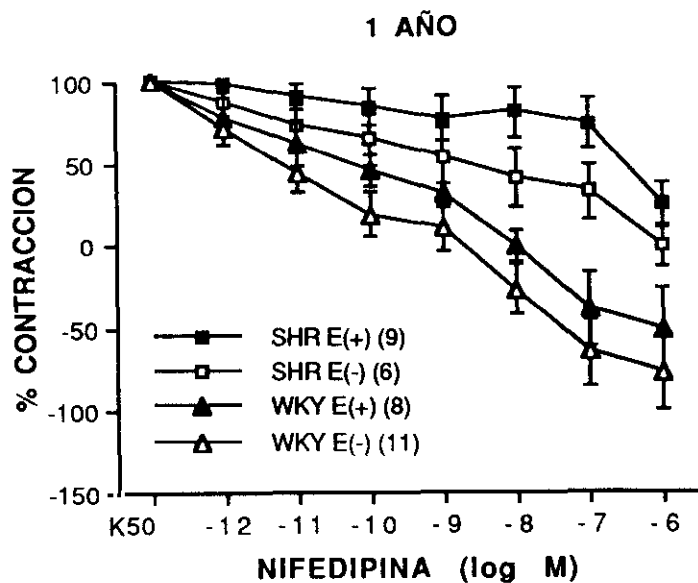
**Fig. 9.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 3 meses de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución despolarizante de  $K^+$  50 mM. La expresión de los resultados es igual a los de la Fig. 8. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las cepas WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían endotelio o no.

\*  $p < 0.05$     \*\*  $p < 0.02$ .



log M	SHR E(+)	SHR E(+)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	95,6 ± 3	93,3 ± 0,9	100 ± 0	97,7 ± 9
-11	72,3 ± 7	85,4 ± 4,2	98,7 ± 0 *	66,1 ± 11
-10	47,5 ± 8	67,1 ± 7,2	89,0 ± 3 **	40,8 ± 20
-9	16,2 ± 6	51,7 ± 7,6	68,5 ± 10 **	22,6 ± 17 **
-8	-4,7 ± 5	16,4 ± 6,7	43,3 ± 8 **	-5,8 ± 28
-7	-30,0 ± 16	-3,6 ± 7,4	14,3 ± 8 *	-20,9 ± 36
-6	-37,3 ± 18	-16,5 ± 10,9	-12,4 ± 17	-27,4 ± 35

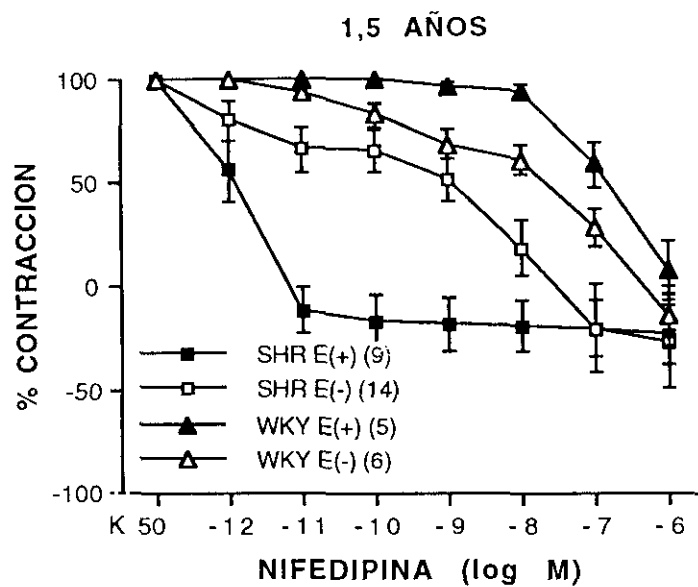
**Fig. 10.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 6 meses de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución despolarizante de  $K^+$  50 mM. La expresión de los resultados es igual a los de la Fig. 8. En la tabla inferior se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	97,8 ± 4	86,8 ± 7	78,2 ± 11	70,4 ± 8
-11	90,6 ± 8	73,5 ± 11	61,0 ± 12	44,1 ± 12
-10	83,9 ± 11	64,1 ± 15	45,7 ± 9	19,0 ± 13
-9	76,6 ± 14	53,8 ± 16	30,7 ± 6 *	10,1 ± 13 *
-8	80,2 ± 15	41,2 ± 18	-0,7 ± 9 *	-27,6 ± 15 **
-7	73,4 ± 15	32,1 ± 17	-33,8 ± 22 **	-65,7 ± 20 **
-6	25,0 ± 9	-1,6 ± 12	-52,8 ± 27 **	-78,6 ± 21 **

**Fig. 11.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1 año de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución despolarizante de  $K^+$  50 mM. La expresión de los resultados es igual a los de la Fig. 8. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio.

\*  $p < 0,05$     \*\*  $p < 0,02$ .



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	55,87 ± 14	80,4 ± 9,9	100 ± 0 *	100 ± 0
-11	-11,0 ± 11	66,0 ± 10,7	100 ± 0 **	93,5 ± 3
-10	-16,2 ± 12	65,4 ± 9,7	100 ± 0 **	82,8 ± 5
-9	-18,2 ± 12	51,5 ± 9,8	95,9 ± 2 **	68,5 ± 6
-8	-18,7 ± 12	18,4 ± 13,3	94,1 ± 2 **	60,8 ± 7
-7	-19,9 ± 13	-19,9 ± 20,7	58,4 ± 10 **	27,9 ± 9
-6	-22,7 ± 13	-26,4 ± 21,9	7,2 ± 14	-13,8 ± 14

**Fig. 12.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1,5 años de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución despolarizante de  $K^+$  50 mM. La expresión de los resultados es igual a los de la Fig. 8. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio.

\*  $p < 0,05$     \*\*  $p < 0,02$ .

**Tabla 1.-** Respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA  $10^{-7}$  M y  $K^{+}$  50 mM y su variación en función del endotelio, la cepa y la edad.

		NA	K
5 SEMANAS	SHR	E(+) 625±247 (4)	650±113 (4)
		E(-) 300±67 (5)	1020±112 (5)
	WKY	E(+) 488±79 (11)	550±147 (5)
		E(-) 737±67 (7)	512±83 (9) Φ
3 MESES	SHR	E(+) 1282±223 (10)	1918±211 (8) #
		E(-) 966±150 (4) #	2190±149 (8) #
	WKY	E(+) 1037±197 (10) #	1671±315 (7) #
		E(-) 1048±142 (6)	958±120 (6) Φ
6 MESES	SHR	E(+) 683±182 (9)	878±90 (7)
		E(-) 1206±192 (7) #	1218±301 (11)
	WKY	E(+) 794±109 (12) #	1420±333 (10) Φ
		E(-) 1204±150 (8) #	893±124 (15) *
1 AÑO	SHR	E(+) 895±125 (17)	1905±246 (9) #
		E(-) 964±106 (17) #	1416±110 (6) #
	WKY	E(+) 1533±276 (12) Φ #	1312±213(5) Φ #
		E(-) 850±151 (7)	850±160 (5) Φ
1,5 AÑOS	SHR	E(+) 1119±169 (13)	833±74 (9)
		E(-) 1450±380 (7)	2094±292 (14) *
	WKY	E(+) 520±25 (5) Φ	730±186 (5)
		E(-) 1125±138 (6) Φ #	1108±145 (6)Φ #

Entre paréntesis se indica el número de segmentos utilizados.

\*  $p < 0,05$  entre segmentos arteriales con (E+) y sin endotelio (E-) para cada cepa y edad.

Φ  $p < 0,05$  entre cepas dentro de cada grupo de edad.

#  $p < 0,05$  entre cada una de las edades y la de 5 semanas.

**Tabla 2.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (cepa y concentración de nifedipina) para cada una de las edades y en segmentos con E(+) y sin E(-) endotelio y contraídos con NA  $10^{-7}$  M o K<sup>+</sup> 50 mM.

	<u><b>CEPA</b></u>		<u><b>CEPA + CONCENTRACION</b></u>	
	<b>NA 0,1 <math>\mu</math>M</b>	<b>K<sup>+</sup> 50 mM</b>	<b>NA 0,1 <math>\mu</math>M</b>	<b>K<sup>+</sup> 50 mM</b>
<b>E(+)</b>	,7798	,0010	,9480	,0050
<b>E(-)</b>	,0001	,0048	,2845	,3043
<b>5 semanas</b>	,2131	,1071	,6528	,8589
<b>3 meses</b>	,0010	,5064	,1933	,0018
<b>6 meses</b>	,9922	,1016	,0253	,7264
<b>1 año</b>	,0010	,0185	,6840	,1967
<b>1,5 años</b>	,9806	,0010	1,000	,0886

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular de la nifedipina. El factor concentración siempre dio significativo.



### 2.1.2.- Arterias precontraídas con NA $10^{-7}$ M

La relajación producida por la nifedipina en segmentos de aorta procedentes de ratas de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años fue, en general, mayor en los procedentes de la cepa SHR que de la WKY, tanto en presencia como en ausencia de endotelio.

En segmentos procedentes de ratas de 5 semanas y utilizando la t de Student, se observaron diferencias entre una cepa y otra a concentraciones altas de nifedipina ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M), independientemente de la presencia o ausencia de endotelio (Fig. 13). Sin embargo, el análisis de la varianza de dos factores dio como resultado que la cepa no influía en las curvas concentración-respuesta a nifedipina en esta edad (Tabla 2).

En segmentos arteriales con endotelio de ratas de 3 meses se observaron diferencias estadísticamente significativas (t de Student) entre ambas cepas en toda la curva concentración-respuesta. Sin embargo en los segmentos sin endotelio, las diferencias sólo se obtuvieron a las concentraciones entre  $10^{-12}$  a  $10^{-10}$  M de nifedipina (Fig. 14). Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores, se observaron diferencias entre una cepa y otra con valor de **p** de **0,001** (Tabla 2). Además, estas diferencias fueron independientes de la concentración (**p** < 0,1933). Estos valores confirman que a los 3 meses, las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina dependen de la cepa a la que pertenecen los segmentos.

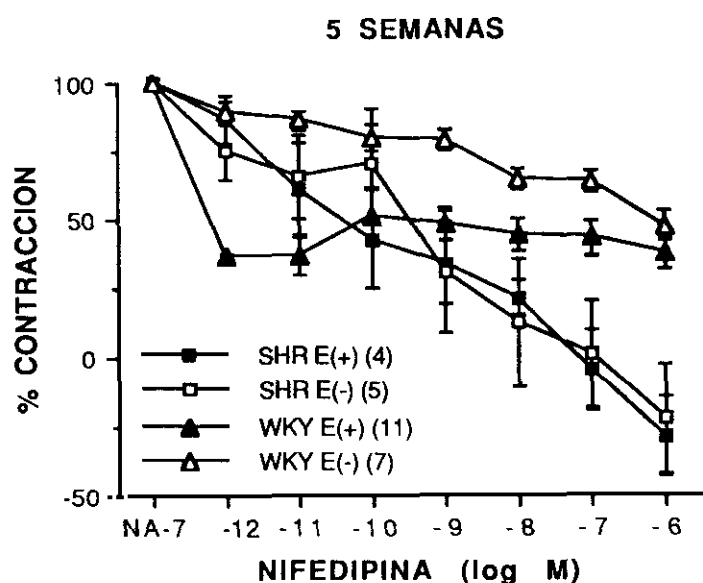
A diferencia de lo que ocurre a los 3 meses, a los 6 meses, el efecto relajante de la nifedipina era prácticamente el mismo en las dos cepas con o sin endotelio (Fig. 15), siendo el valor de **p** en el análisis de la varianza de **0,9922** (Tabla 2).

En ratas de 1 año, sólo se observaron diferencias en los segmentos sin endotelio, siendo a concentraciones altas ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) mayor el efecto relajante en las ratas WKY que en las SHR (Fig.16). El análisis de la varianza de dos factores dió como resultado un valor de  $p < 0.05$  (Tabla 2). Por lo tanto, a esta edad, el efecto vasodilatador de la nifedipina está modulado por el tipo de cepa al que pertenezcan los segmentos arteriales.

A la edad de 1,5 años no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas (Fig. 17). Igualmente el análisis de la varianza de dos factores ratificó este dato (Tabla 2).

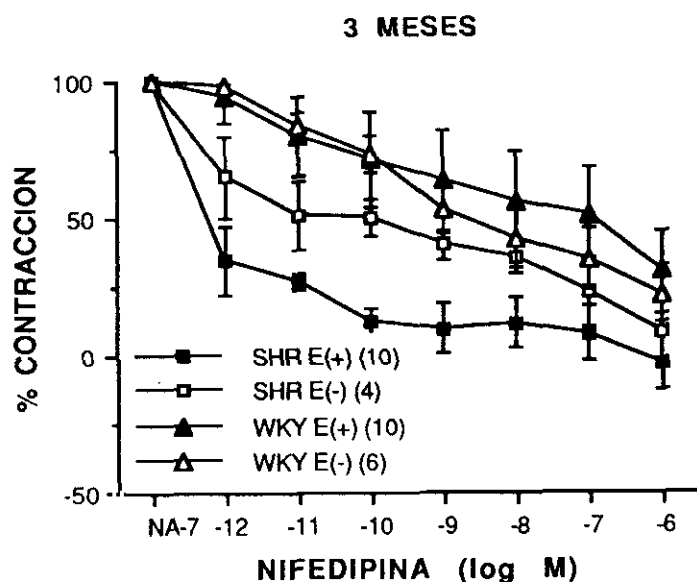
Cuando se efectuó el análisis de la varianza, teniendo en cuenta toda la población de segmentos con o sin endotelio, se observó que el efecto vasodilatador de la nifedipina fue significativamente distinto en la cepa SHR y WKY sólo en los segmentos que están desprovistos de endotelio (Tabla 2).

Se realizó también un análisis de la varianza para comprobar si las respuestas relajantes a nifedipina del conjunto de arterias WKY o SHR, eran distintas en función del agente vasoconstrictor utilizado, obteniendo en la cepa WKY un valor de  $p = 0,0697$  y en la cepa SHR  $p = 0,1667$ , lo que indica que las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina tanto en la cepa SHR como WKY son independientes del agente vasoconstrictor utilizado.



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	86,5 ± 9	75,2 ± 11	36,2 ± 1	89,6 ± 4
-11	60,9 ± 17	65,7 ± 15	36,7 ± 7	86,1 ± 3
-10	42,7 ± 17	70,2 ± 20	50,7 ± 11	79,8 ± 5
-9	33,8 ± 15	30,6 ± 22	48,0 ± 6	78,7 ± 4 *
-8	21,3 ± 6	22,7 ± 12	44,2 ± 5 *	64,5 ± 3 *
-7	-4,4 ± 14	0,57 ± 20	42,8 ± 6 *	63,1 ± 4 **
-6	-29,1 ± 14	-22,3 ± 20	37,5 ± 6 *	47,4 ± 5 **

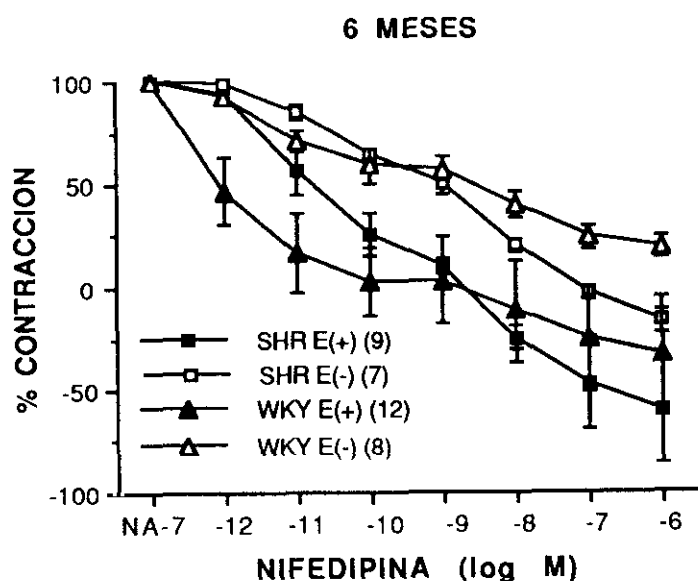
**Fig. 13.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 5 semanas de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de NA  $10^{-7}$  M. Los valores medios de dichas contracciones y el error estándar aparecen en la Tabla 1. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora originada por NA  $10^{-7}$  M. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	34,8 ± 12	65 ± 15	94,4 ± 9 **	97,6 ± 1 *
-11	27 ± 3	51 ± 12	79,9 ± 14 **	84,0 ± 4 *
-10	12,5 ± 5	50 ± 7	71,4 ± 17 *	73,3 ± 7 *
-9	10,0 ± 5	40 ± 5,3	63,5 ± 18 *	53,1 ± 9
-8	11,8 ± 9	36 ± 6,8	55,8 ± 18 *	42,4 ± 10 *
-7	8,0 ± 10	23 ± 12,5	50,7 ± 17 *	34,8 ± 11
-6	-2,6 ± 10	8,9 ± 12,5	30,6 ± 15 **	22,4 ± 9

**Fig. 14.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos de ratas con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 3 meses de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de NA  $10^{-7}$  M. La expresión de los resultados son iguales a los de la Fig. 13. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio.

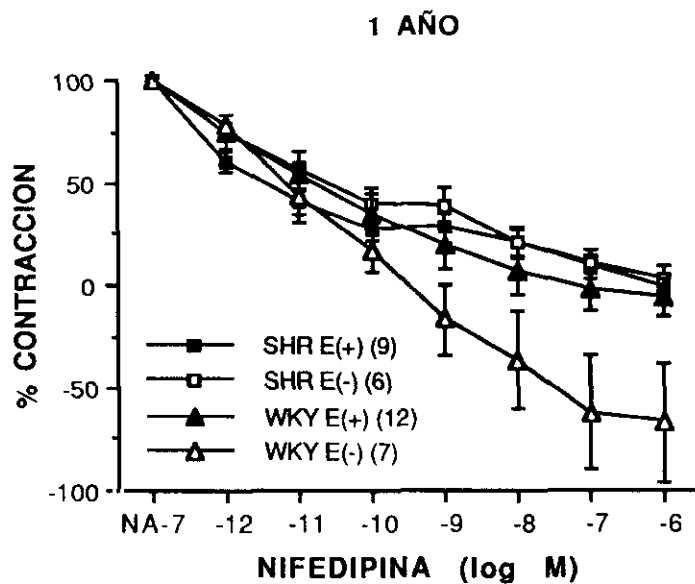
\*  $p < 0.05$  , \*\*  $p < 0.02$ .



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	94,1 ± 4	98,7 ± 0	46,7 ± 16 *	92,1 ± 3
-11	56,0 ± 11	84,8 ± 4	16,5 ± 19	70,7 ± 5
-10	25,5 ± 11	64,0 ± 3	3,0 ± 16	58,7 ± 8
-9	10,0 ± 4	50,0 ± 5	3,1 ± 20	56,6 ± 5
-8	-25 ± 5,2	20,0 ± 3	-12,1 ± 24	39,4 ± 6
-7	-46,8 ± 23	-3,1 ± 3	-25,8 ± 25	23,8 ± 5
-6	-60,4 ± 26	-16,9 ± 5	-33,7 ± 28	19,0 ± 5

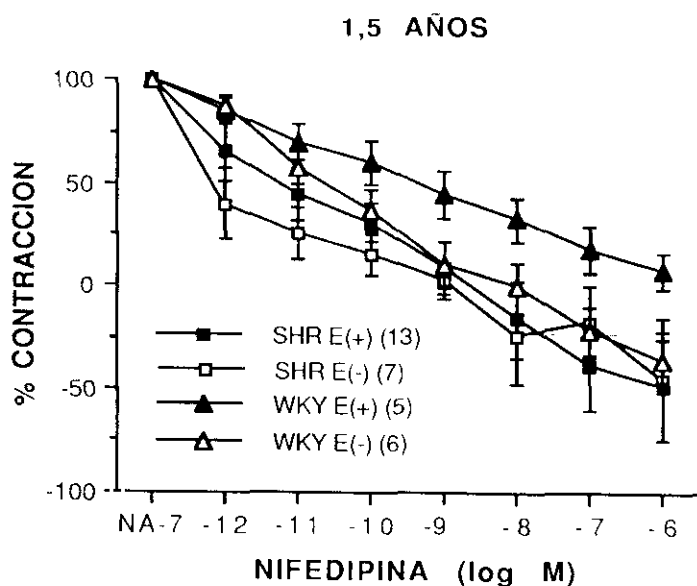
**Fig. 15.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M), en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 6 meses de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de NA  $10^{-7}$  M. La expresión de los resultados son iguales a los de la Fig.13. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio.

\*  $p < 0,05$     \*\*  $p < 0,02$ .



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	59,7 ± 5	74,4 ± 8	75,0 ± 4	78,4 ± 5
-11	41,1 ± 10	56,0 ± 9	54,2 ± 6	43,8 ± 9
-10	26,8 ± 5	39,5 ± 7	34,5 ± 10	16,4 ± 10
-9	27,6 ± 7	38,6 ± 9	18,9 ± 11	-17,3 ± 17 **
-8	20,7 ± 6	20,7 ± 7	6,3 ± 11	-36,6 ± 24 **
-7	9,6 ± 4	9,9 ± 9	-2,8 ± 9	-62,2 ± 28 **
-6	-0,8 ± 4	2,3 ± 6	-6,2 ± 9	-67,0 ± 29 **

**Fig. 16.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1 año de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de NA  $10^{-7}$ M. La expresión de los resultados son iguales a los de la Fig .13. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	64,9 ± 13	40 ± 17	85,1 ± 6	87,4 ± 5 *
-11	44,9 ± 12	25,6 ± 13	69,7 ± 8	58,1 ± 8
-10	31,1 ± 9	15,6 ± 9	60,2 ± 10	37,5 ± 10
-9	8,9 ± 12	2,4 ± 9	44,8 ± 12	9,7 ± 11
-8	-15,7 ± 18	-24,8 ± 22	32,9 ± 11	-0,6 ± 12
-7	-38,4 ± 21	-17,3 ± 17	17,8 ± 11	-21,9 ± 11
-6	-48,5 ± 26	-45,0 ± 29	-7,3 ± 8	-35,8 ± 10

**Fig. 17.-** Curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1,5 años de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de NA  $10^{-7}$  M. La expresión de los resultados son iguales a los de la Fig. 13. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción residual (%) y el error estándar para cada una de las concentraciones de nifedipina. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre las WKY y SHR cuando los segmentos aórticos tenían o no endotelio.

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

## **2.2.- Influencia de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina**

Con el fin de estudiar la influencia de la edad sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por nifedipina, se analizaron las respuestas obtenidas en las diferentes edades por análisis de la varianza y por la t de Student. En este último caso, se compararon las respuestas de todas las edades con las de las arterias procedentes de animales de 5 semanas. El análisis de la varianza se hizo teniendo en cuenta los factores, edad y concentración del fármaco.

### **2.2.1.- Arterias precontraídas con $K^+$ 50 mM**

La Fig. 18 muestra el efecto de la edad sobre la relajación inducida por nifedipina en segmentos de la cepa SHR. Como se puede observar en dicha figura su eficacia fue mayor en aortas de ratas de 1,5 años, seguidas por las de 3 meses, siendo las de 1 año las que mostraban menor respuesta relajadora. La dilatación en aortas de 6 meses fue de tipo intermedio sobre todo a concentraciones bajas. La supresión del endotelio redujo la respuesta dilatadora de la nifedipina en las arterias de la cepa SHR a todas las edades estudiadas, aunque a dosis altas ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$ ) se observaron respuestas similares a las obtenidas en presencia de endotelio. Las arterias de 3 meses parecen ser las más sensibles a nifedipina (Fig. 18).

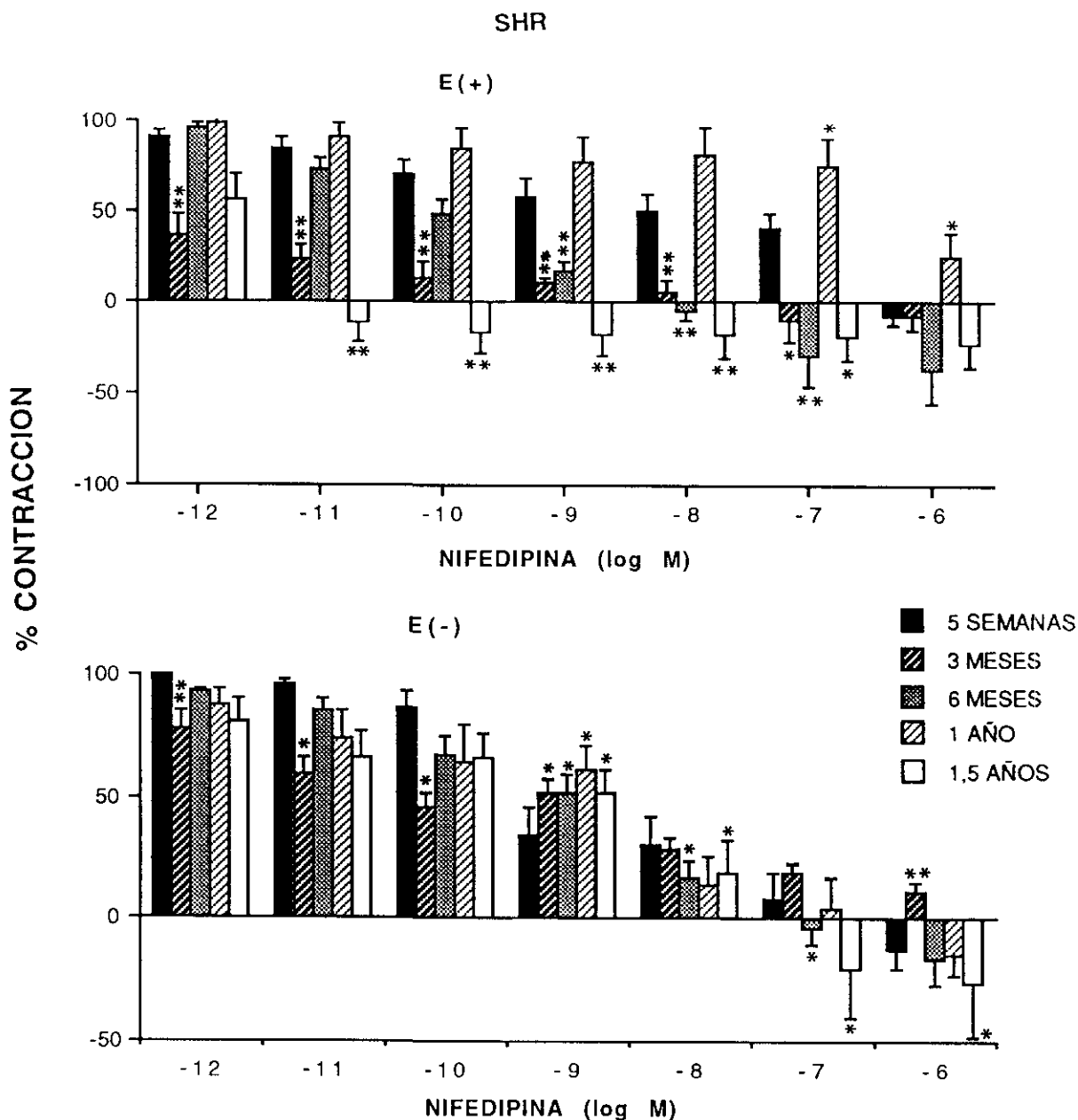
En arterias WKY de diferentes edades con endotelio, la sensibilidad a nifedipina fue mayor en las de 1 año y la menor la de 1,5 años, al compararla con las de 5 semanas (Fig. 19). A 3 meses y 6 meses, las respuestas son similares que los de 5 semanas. Similar fenómeno se observó en las arterias sin endotelio con respecto a la edad (Fig. 19), aunque la sensibilidad a la nifedipina parece incrementarse al suprimir este componente vascular.



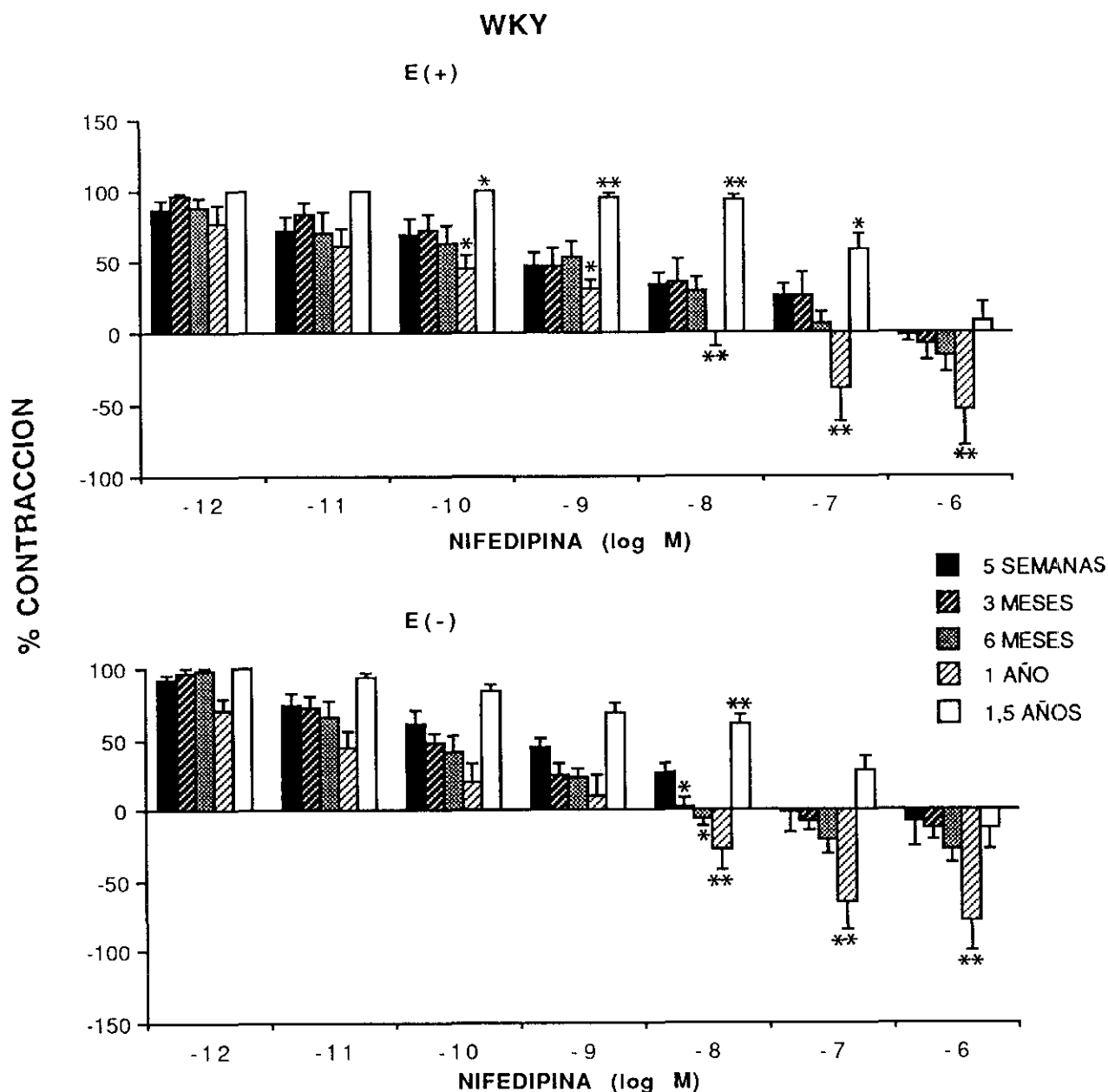
Cuando se analizaron de forma global los resultados obtenidos a todas las concentraciones de nifedipina en cada uno de los grupos de arterias precontraídas con  $K^+$  50 mM mediante el análisis de la varianza (Tabla 3), se observó que la edad influye en las respuestas a este fármaco tanto en las arterias hipertensas como controles con y sin endotelio.

En el caso de la cepa SHR con y sin endotelio, la interacción entre la edad y la concentración dió un valor de  $p < 0,05$ , lo que hace suponer que la influencia de la edad en las respuestas originadas por la nifedipina en este tipo de cepa van a depender además de la concentración de fármaco utilizada (Tabla 3).

En la cepa WKY, cuando los segmentos tienen endotelio, la edad del animal puede modificar las respuestas vasculares de la nifedipina de forma similar a todas las concentraciones. No sucede lo mismo en los segmentos sin endotelio, donde en este caso la influencia de la edad depende de la concentración de nifedipina utilizada (Tabla 3).



**Fig. 18.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los segmentos previamente se contrajeron con una solución despolarizante de  $K^+$  50 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por el  $K^+$  50 mM, cuyos valores medios y el error estándar aparecen en la Tabla 1. Cada histograma representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 4 y 14. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



**Fig. 19.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los segmentos previamente se contrajeron con una solución despolarizante de  $K^+$  50 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por la solución de  $K^+$  50 mM, cuyos valores medios y el error estándar aparecen en la Tabla 1. Cada histograma representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 5 y 15. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

**Tabla 3.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (edad y concentración de nifedipina) para cada una de las cepas con (E+) y sin (E-) endotelio y contraídos con NA  $10^{-7}$  M o K<sup>+</sup> 50 mM.

	<u>EDAD</u>		<u>EDAD + CONCENTRACION</u>	
	NA 0,1 $\mu$ M	K <sup>+</sup> 50mM	NA 0,1 $\mu$ M	K <sup>+</sup> 50mM
<b>SHR (+)</b>	,0010	,0010	,0010	,0090
<b>SHR (-)</b>	,0683	,0001	,0967	,0325
<b>WKY (+)</b>	,0001	,0010	,0001	,7141
<b>WKY (-)</b>	,0001	,0010	,0009	,0029

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular de la nifedipina en la población experimental. El factor concentración dio siempre significativo

### 2.2.2.- Arterias precontraídas con NA $10^{-7}$ M

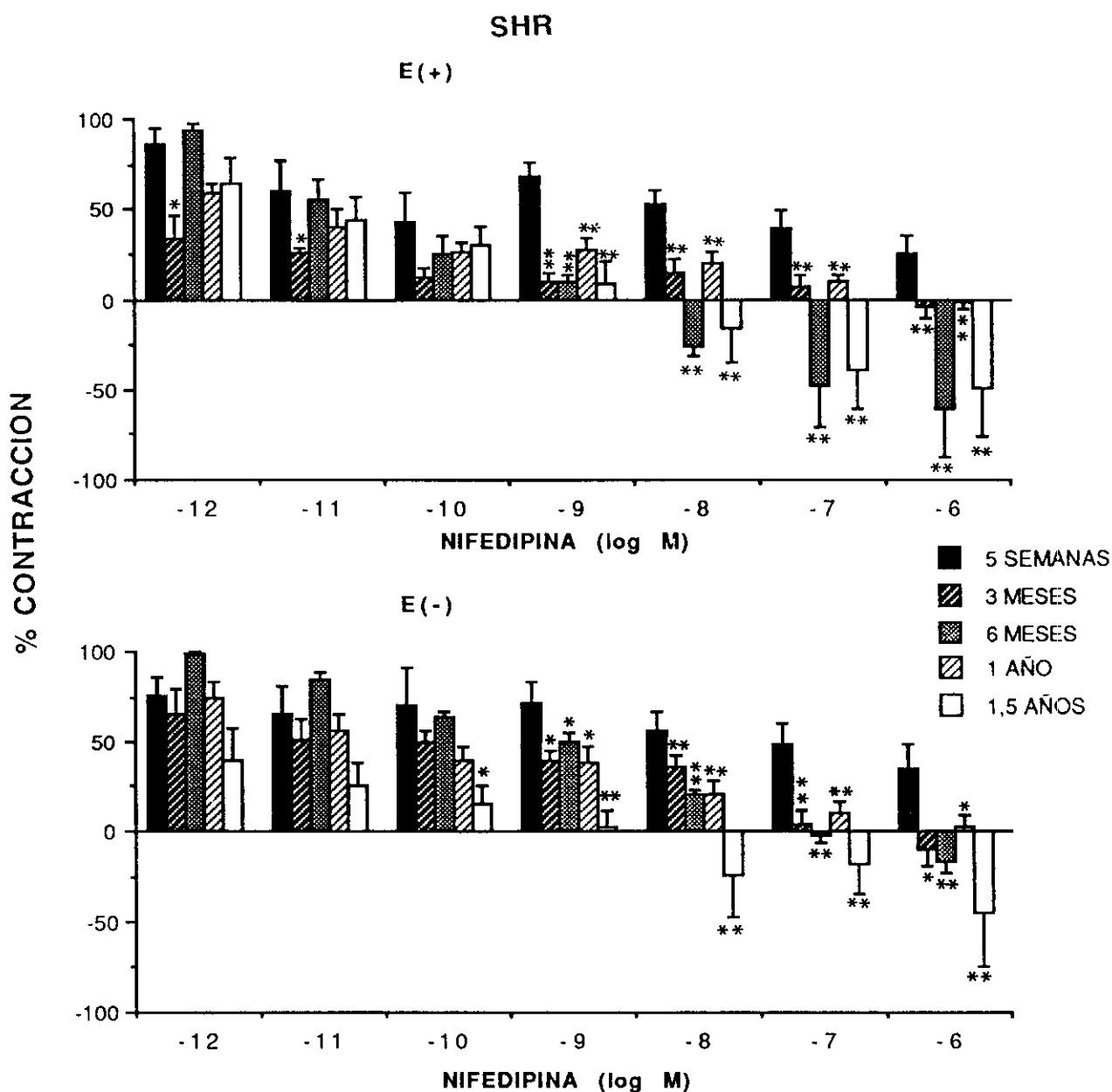
Cuando se efectuaron las curvas concentración-respuesta en arterias precontraídas con NA  $10^{-7}$  M, el estudio realizado en función de la edad, dio los siguientes resultados para cada una de las cepas:

En los segmentos arteriales con endotelio de la cepa SHR, se observó que los procedentes de ratas de 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años presentaban una tendencia a relajar más que los de 5 semanas especialmente a partir de  $10^{-9}$  M de nifedipina y sobre todo los de 6 meses y 1,5 años (Fig. 20). Un fenómeno similar se observó en segmentos de la cepa SHR sin endotelio, siendo los segmentos de 1,5 años los que presentaron mayor respuesta vasodilatadora a nifedipina (Fig. 20).

Cuando los segmentos aórticos procedían de ratas WKY de diferentes edades y estaban provistos de endotelio, las respuestas a nifedipina se redujeron a las concentraciones bajas con respecto a las obtenidas en segmentos de 5 semanas. Sin embargo, a partir de  $10^{-9}$  M de nifedipina esta tendencia pareció invertirse fundamentalmente en los segmentos de 6 meses y 1 año (Fig. 20). En segmentos sin endotelio, se observó una tendencia a mayor relajación con nifedipina a todas las edades comparada con la obtenida en los segmentos de 5 semanas. Los segmentos de 1 año y año y medio presentaron mayor respuesta relajadora (Fig. 21).

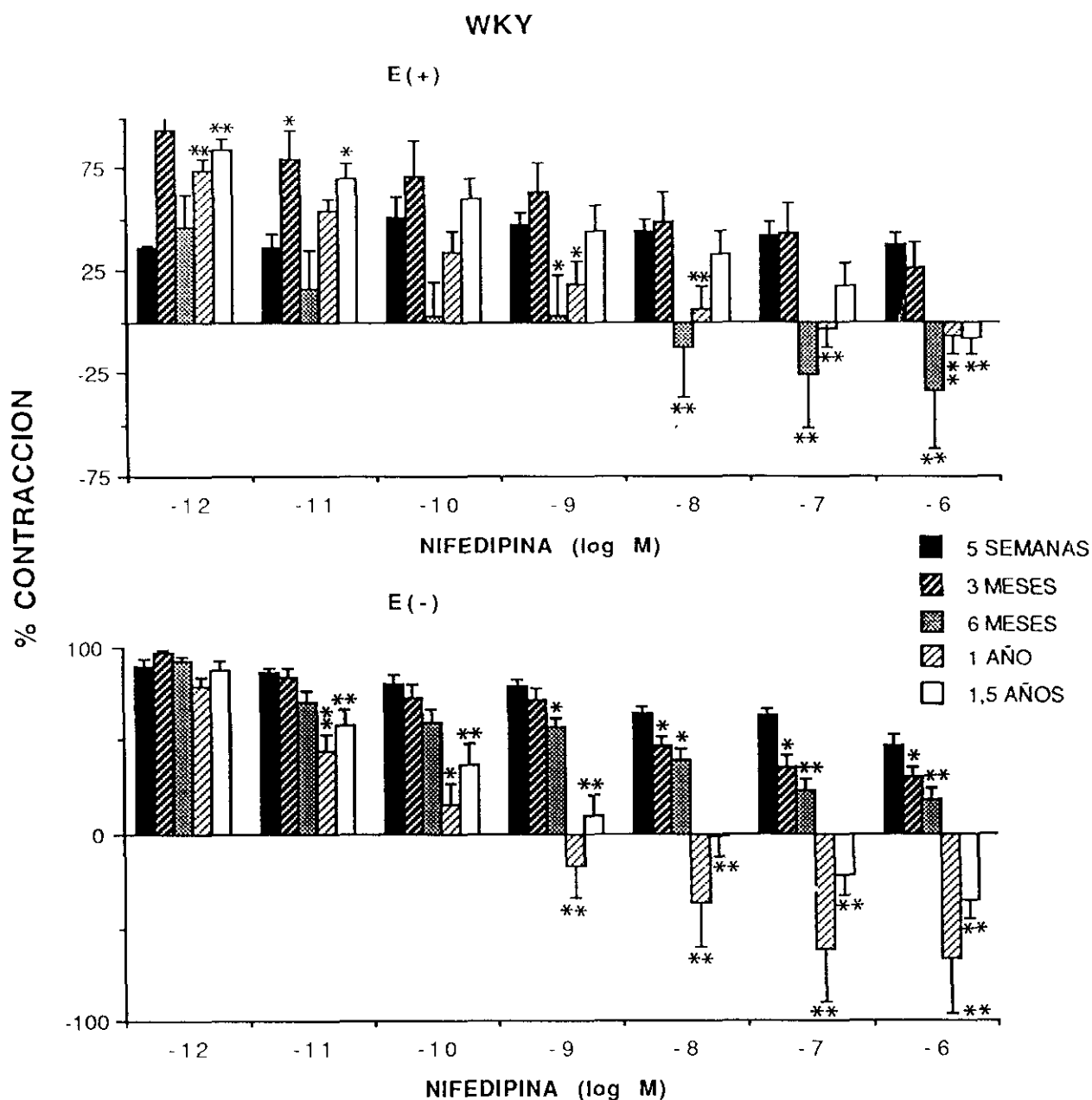
El análisis de la varianza de dos factores dió como resultado que tanto en las ratas hipertensas con endotelio como en las normotensas con y sin endotelio, la edad influía de manera significativa en las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina (Tabla 3). Igualmente los valores de la interacción de la edad y concentración, son consecuencia de que la influencia de la edad es dependiente de la concentraciones de fármaco.

Se puede decir, por tanto, que la edad del animal es un factor que modifica las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina en ratas SHR y WKY cuando los segmentos se contraen tanto con NA  $10^{-7}$  M como con K<sup>+</sup> 50 mM.



**Fig. 20.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de NA  $10^{-7}$  M. Los resultados están expresados en % de contracción residual de la respuesta vasoconstrictora originada por la solución de NA  $10^{-7}$  M, cuyos valores medios y el error estándar aparecen en la Tabla 1. Cada histograma representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 4 y 17. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas.

\*  $p < 0,05$     \*\*  $p < 0,02$ .



**Fig. 21.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los segmentos previamente se contrajeron con una solución de NA  $10^{-7}$  M. Los resultados se expresaron en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por NA  $10^{-7}$  M, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 1. Cada histograma representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 5 y 12. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



### **2.3.- Influencia del endotelio en las curvas concentración-respuesta a nifedipina.**

Para analizar la influencia del endotelio en las respuesta producidas por la nifedipina, se compararon las respuestas vasodilatadoras inducidas por dicho fármaco en segmentos aórticos con y sin endotelio procedentes de ratas WKY y SHR de las edades mencionadas anteriormente. La comparación entre los segmentos con y sin endotelio se hizo en cada caso mediante la t de Student para cada concentración y mediante el análisis de la varianza de dos factores, en el que uno de los factores fue la presencia o no de endotelio y el otro la concentración de fármaco.

#### **2.3.1.- Arterias precontraídas con $K^+$ 50 mM**

El efecto relajante de la nifedipina en segmentos de ratas pertenecientes a la cepa SHR era mayor, en general, en los segmentos arteriales que presentaban endotelio que en los que no lo tenían. Se observaron diferencias significativas a los 3 meses ( $10^{-12}$ - $10^{-10}$  M), 6 meses ( $10^{-9}$  M) y 1,5 años ( $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  M) (Fig. 22).

Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores, se observó que la presencia de endotelio en la cepa SHR influía en la respuesta de este antagonista al dar un valor de  $p = 0,001$ . Sin embargo, este efecto también está mediado por la concentración de nifedipina utilizada, ya que al analizar la interacción del endotelio con la concentración se obtuvo un valor de  $p = 0,021$  (Tabla 4).

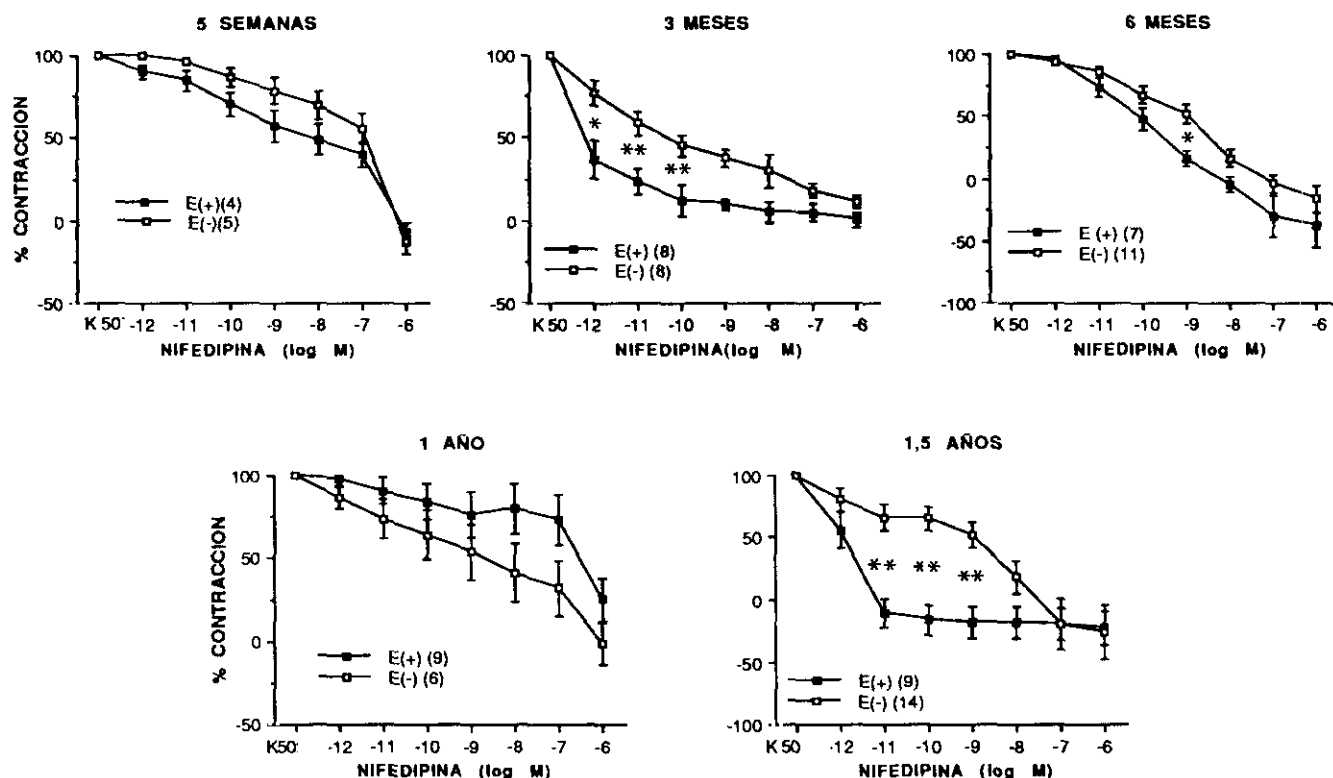
En las ratas WKY, ocurrió lo contrario, siendo la tendencia de la nifedipina a relajar más en segmentos sin endotelio. Se observaron algunas diferencias significativas entre los segmentos con y sin endotelio a las edades de 3 meses, 6 meses y 1,5 años de edad (Fig. 23).

El análisis de la varianza de dos factores dio como resultado que la presencia o ausencia de endotelio en la cepa WKY influye muy significativamente en las respuestas originadas por la nifedipina, dando un valor de  $p= 0,001$ . (Tabla 4). Sin embargo, este análisis mostró que el efecto del endotelio no era dependiente de la concentración de fármaco.

Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores para cada una de las edades, se comprobó que a la edad de 5 semanas, 1 año y 1,5 años las respuestas de la nifedipina podían estar modificadas en función de la presencia o ausencia de endotelio (Tabla 4).

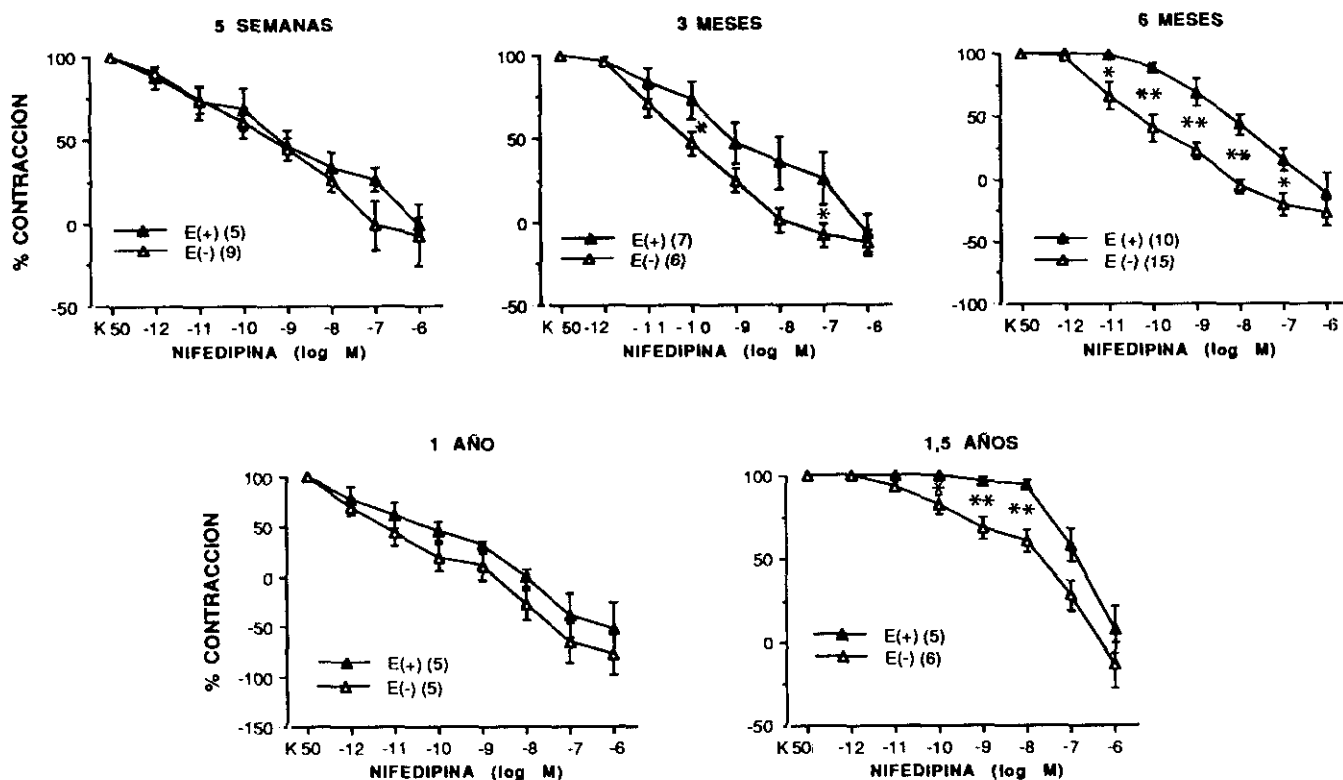
Estos resultados, permiten concluir que el endotelio, tanto en la cepa SHR como WKY, es un factor que influye positivamente en la respuesta vasodilatadora de la nifedipina en la cepa SHR y negativamente en la WKY.

# SHR



**Fig. 22.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a nifedipina en segmentos aórticos procedentes de las cepas SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. La nifedipina se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M), una vez alcanzado un tono de contracción estable con  $K^+$  50 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por  $K^+$  50 mM cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 1. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$

# WKY



**Fig. 23.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a nifedipina en segmentos aórticos procedentes de las cepas WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. La nifedipina se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M), una vez alcanzado un tono de contracción estable con  $K^+$  50 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por  $K^+$  50 mM, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 1. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

**Tabla 4.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (endotelio y concentración de nifedipina) dentro de la misma cepa y para cada una de las edades y contraídos con NA  $10^{-7}$  M o K<sup>+</sup> 50 mM.

	<u>ENDOTELIO</u>		<u>ENDOTELIO + CONCENTRACION</u>	
	NA 0,1 $\mu$ M	K <sup>+</sup> 50 mM	NA 0,1 $\mu$ M	K <sup>+</sup> 50 mM
<b>SHR</b>	,0002	,0010	,7959	,0210
<b>WKY</b>	,0010	,0010	,7017	,4352
<b>5 semanas</b>	,0010	,0223	,9140	,6532
<b>3 meses</b>	,0010	,2611	,2901	,0007
<b>6 meses</b>	,0010	,0722	,8812	,8899
<b>1 año</b>	,1961	,0007	,8660	,4834
<b>1,5 años</b>	,2974	,0081	,6528	,1929

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular de la nifedipina en la población experimental. El factor concentración siempre dio significativo.

### 2.3.2.- Arterias precontraídas con NA $10^{-7}$ M

La tendencia de las respuestas relajadoras producidas por nifedipina en segmentos procedentes de la cepa SHR contraídos con NA  $10^{-7}$  M era mayor en presencia de endotelio. Como se observa en la Fig. 24, a los 3 y 6 meses, la existencia de endotelio influyó significativamente en la respuesta a nifedipina. Sin embargo, a las edades de 5 semanas, 1 año y 1,5 años, el efecto de la nifedipina no fue dependiente de la presencia o no de endotelio.

Al realizar el análisis de la varianza de dos factores, se comprobó que la presencia o no de endotelio en la cepa SHR influía en la respuesta vascular de este antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo el valor de  $p = 0,0002$  (Tabla 4).

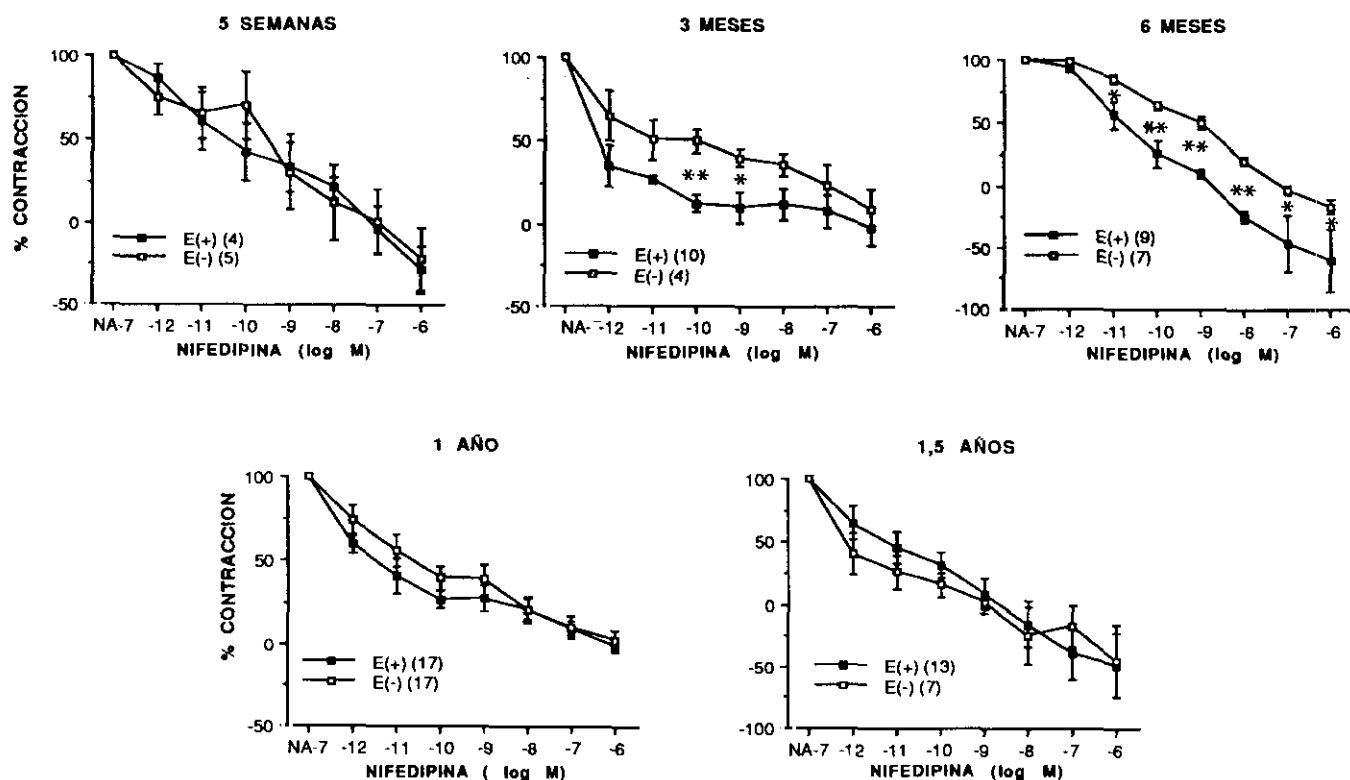
En los segmentos arteriales de la cepa WKY de 5 semanas y 6 meses, se observó un efecto relajante mayor a nifedipina en aquellos segmentos que presentaban endotelio, mientras que el efecto contrario se obtuvo a edades superiores (1 año y 1,5 años). Al determinar la t de Student, se comprobó que a 5 semanas y 6 meses (Fig. 25), había diferencias significativas entre una curva y otra en todos los puntos, mientras que a las edades de 1 año y 1,5 años, sólo se observaron diferencias a las concentraciones altas del fármaco ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  M).

Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores, dió como resultado que la presencia o no de endotelio en la cepa WKY influía en las respuestas a nifedipina, dando un valor de  $p = 0,001$  (Tabla 4).

Al tener en cuenta en el análisis de la varianza cada una de las edades, se comprobó que la presencia de endotelio influía en la respuesta vasodilatadora de este antagonista a las edades de 5 semanas, 3 meses y 6 meses de edad (Tabla 4).

Se puede concluir que las curvas concentración-respuesta a nifedipina en segmentos arteriales de ratas SHR y WKY de diferentes edades precontraídos con NA  $10^{-7}$  M se modificaban por la presencia o no de endotelio.

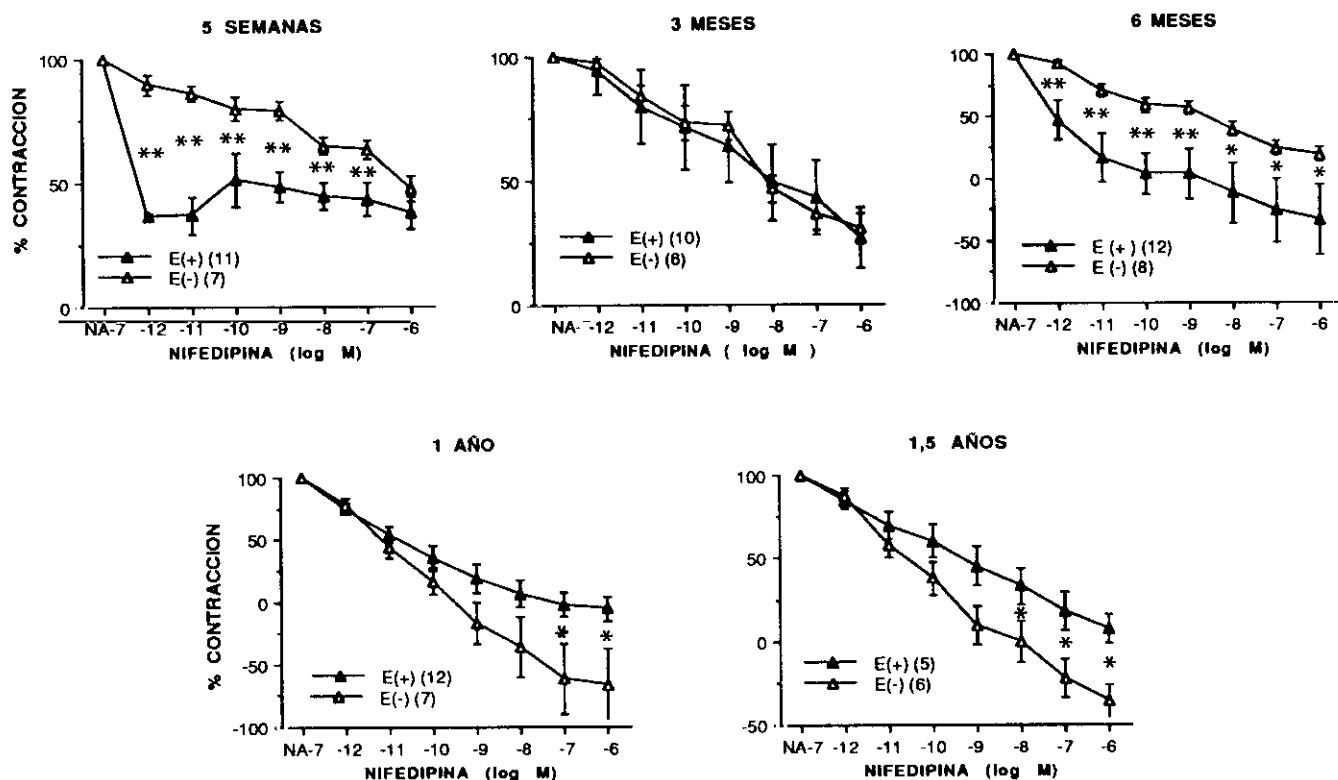
# SHR



**Fig. 24.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a nifedipina en segmentos aórticos procedentes de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. La nifedipina se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M), una vez alcanzado un tono de contracción estable con NA  $10^{-7}$  M. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por NA  $10^{-7}$  M, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 1. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$



# WKY



**Fig. 25.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a nifedipina en segmentos aórticos procedentes de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. La nifedipina se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M), una vez alcanzado un tono de contracción estable con NA  $10^{-7}$  M. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por NA  $10^{-7}$  M, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 1. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$

### 2.3.3.- Papel del óxido nítrico en las respuestas vasodilatadoras a nifedipina.

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que el endotelio puede ser un factor determinante en la respuesta a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Furchgott y Zawadzki demostraron en 1980 que las células endoteliales tenían capacidad para liberar un factor vasodilatador celular que denominaron **EDRF**. Este **EDRF** ha sido químicamente identificado como óxido nítrico (**NO**) y parece originarse a partir del aminoácido L-arginina.

Para estudiar si la liberación endotelial de óxido nítrico modulaba las respuestas vasodilatadoras a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , se eligió como grupo experimental ratas WKY y SHR de 6 meses de edad. En estas ratas se realizaron los siguientes experimentos:

#### **2.3.3.1.- Efecto del L-NAME**

El L-NAME  $10^{-5}$  M ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil éster) es un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (Rees y col., 1990). Con el fin de comprobar si la inhibición de dicha síntesis modificaba la respuesta vasodilatadora a nifedipina, se realizaron curvas concentración-respuesta en segmentos de ratas WKY y SHR preincubados durante 25 min con este inhibidor y contraídos posteriormente con  $\text{K}^+$  50 mM o NA  $10^{-7}$  M.

Los valores en mg de las contracciones inducidas por NA  $10^{-7}$  M y  $\text{K}^+$  50 mM en los diferentes grupos experimentales están reflejados en la Tabla 5. En esta tabla se puede observar que el L-NAME incrementa la respuestas a NA en segmentos aórticos de ambos tipos de arterias y las repuestas a  $\text{K}^+$  sólo en la cepa SHR.

**Tabla 5.-** Valores en mg (media  $\pm$  error estándar) de las contracciones inducidas por NA  $10^{-7}$  M o  $K^+$  50 mM en segmentos aórticos de ratas WKY o SHR de 6 meses en situación control y en presencia de L-NAME  $10^{-5}$  M, L-arginina  $10^{-4}$  M o L-arginina + L- NAME  $10^{-5}$  M.

CONTROL	NA	SHR	683 $\pm$ 182
		WKY	794 $\pm$ 109
	$K^+$	SHR	878 $\pm$ 90
		WKY	1420 $\pm$ 330
L-NAME	NA	SHR	1775 $\pm$ 297 *
		WKY	1470 $\pm$ 215 *
	$K^+$	SHR	1039 $\pm$ 207
		WKY	720 $\pm$ 40 *
L-ARGININA	$K^+$	SHR	880 $\pm$ 144
		WKY	950 $\pm$ 350
L-NAME + L-ARGININA	$K^+$	SHR	1380 $\pm$ 217 *
		WKY	1675 $\pm$ 242

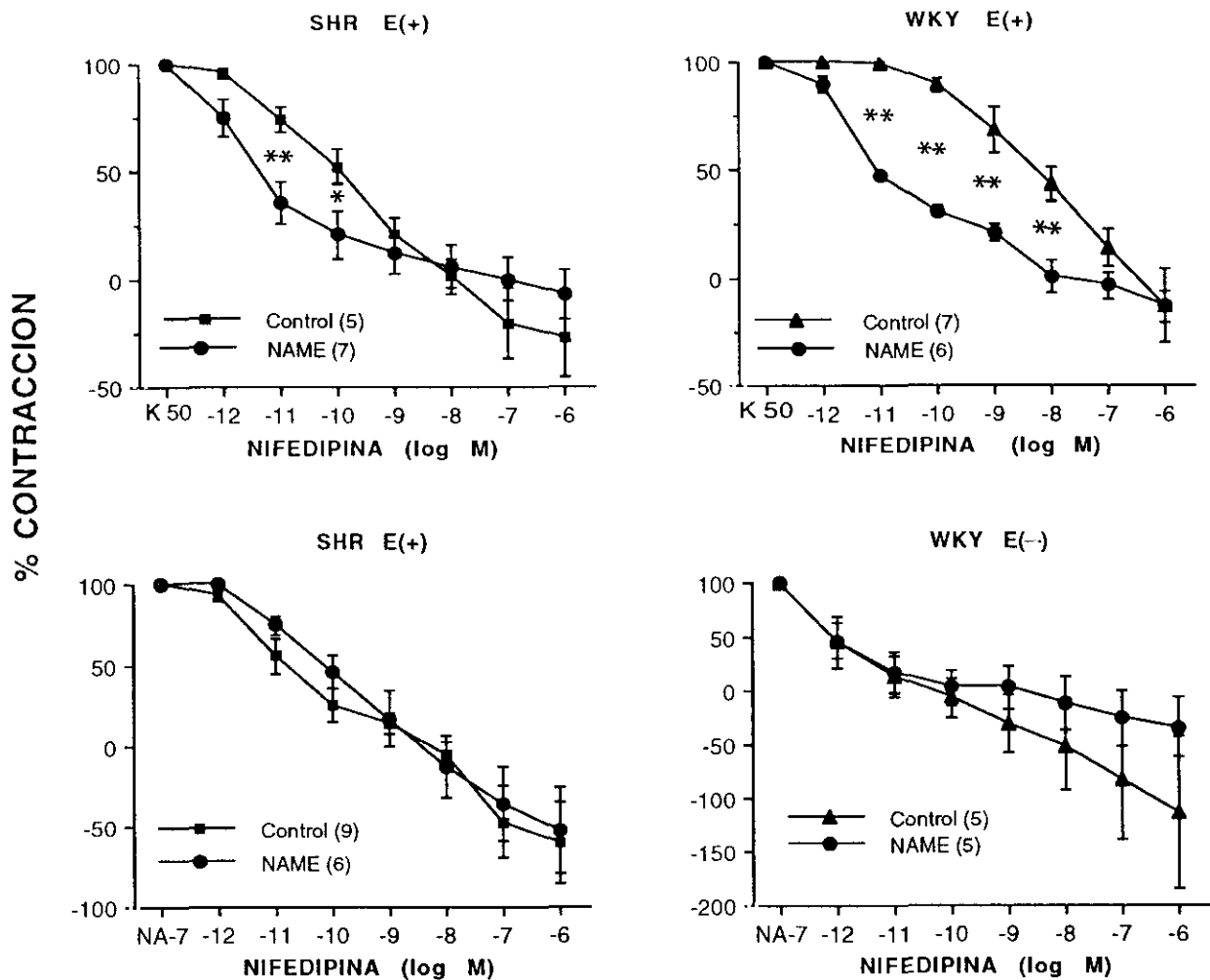
\*  $p < 0,02$  entre cada situación experimental y su control.

#### 2.3.3.1.1.- Arterias precontraídas con $K^+$ 50 mM y NA $10^{-7}$ M

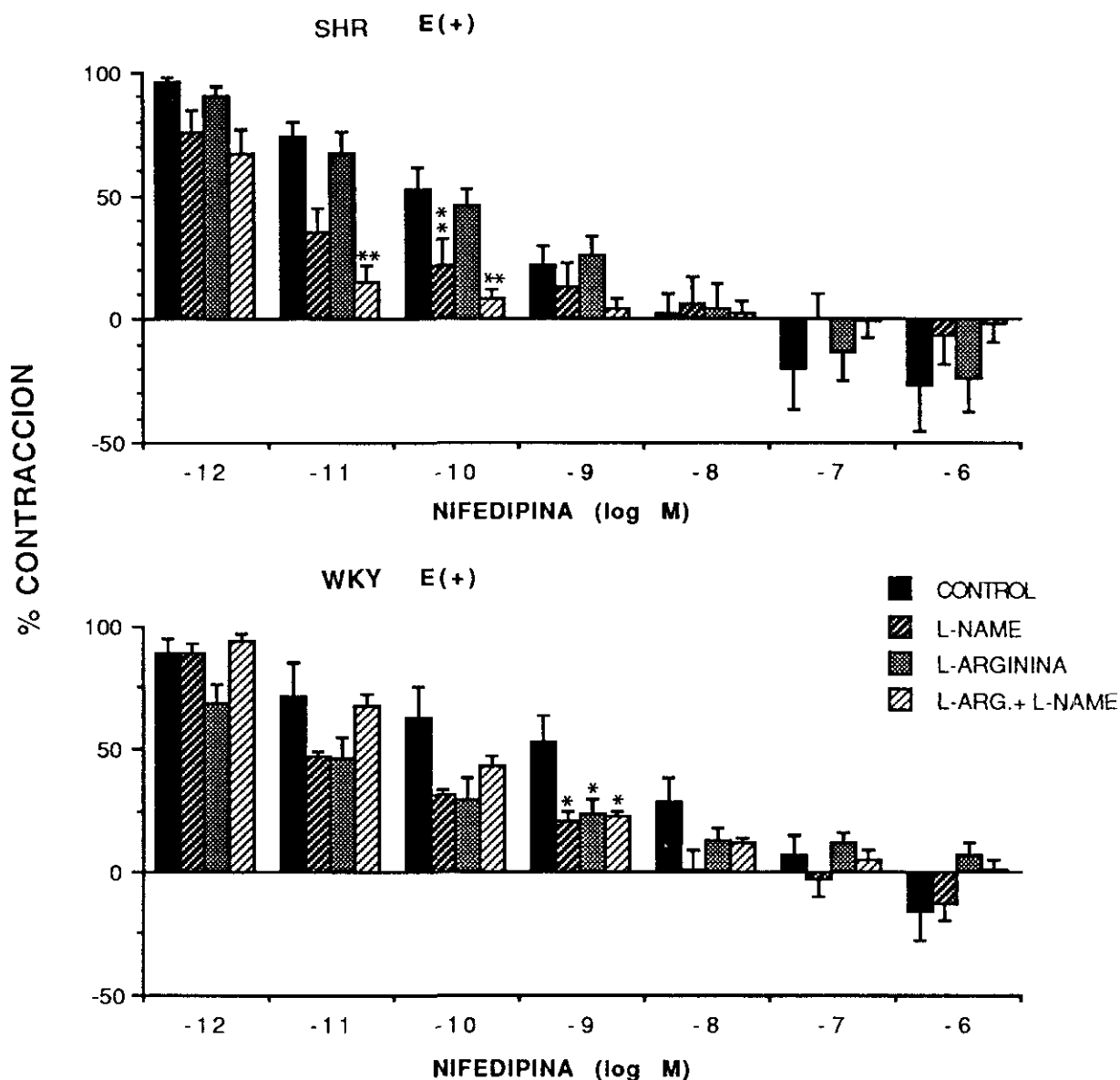
En segmentos con endotelio de las cepas SHR o WKY precontraídas con NA, la administración previa de L-NAME  $10^{-5}$  M no modificó la respuesta a nifedipina, mientras que en los precontraídos con  $K^+$  se produjo un incremento de la relajación a determinadas concentraciones en este antagonista de calcio (Fig. 26)

#### 2.3.3.1.2.- Efecto de la L-arginina y L-arginina más L-NAME

Para investigar el efecto del precursor de la síntesis óxido nítrico sobre las respuestas vasodilatadoras a nifedipina, se incubaron los segmentos arteriales de ambas cepas con L-arginina  $10^{-4}$  M y precontraídos con  $K^+$  50 mM. Los resultados obtenidos indican que este aminoácido no modificó las respuestas vasodilatadoras a nifedipina en vasos de ratas WKY y SHR. La administración conjunta de L-arginina y L-NAME  $10^{-5}$  M, indujo un incremento de la respuesta dilatadora obtenida con nifedipina en la cepa SHR similar al obtenido en presencia sólo de L-NAME (Fig. 27). En la cepa WKY la asociación tampoco modificó la vasodilatación obtenida en presencia de L-NAME.



**Fig. 26.-** Efecto del L-NAME  $10^{-5}$  M sobre la curva concentración-respuesta a nifedipina ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con endotelio (E+) de las cepas SHR y WKY de 6 meses de edad. Los segmentos se contrajeron previamente con una solución de K<sup>+</sup> 50 mM o NA  $10^{-7}$  M, cuyos valores para los distintos casos están reflejados en la Tabla 5. Los resultados están expresados en % de contracción respecto a la originada por una solución de K<sup>+</sup> 50 mM o NA  $10^{-7}$  M. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar. Entre paréntesis el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



**Fig. 27.-** Efecto de L-NAME  $10^{-5}$  M, L-arginina  $10^{-4}$  M y L-NAME  $10^{-5}$  M + L-arginina  $10^{-4}$  M sobre la curva concentración-respuesta a nifedipina en segmentos aórticos procedentes de ratas SHR y WKY de 6 meses de edad con E(+). Los segmentos se contrajeron con una solución de  $K^{+}$  50 mM previamente a la realización de la curva concentración-respuesta a nifedipina. Cada histograma representa la media aritmética de la concentración residual respecto a la originada por la solución de  $K^{+}$  50 mM y las barras verticales el error estándar. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 5 y 12. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada caso y su control. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$

### **3.- CURVAS CONCENTRACION-RESPUESTA A BAY K 8644**

Para analizar el efecto de la cepa, la edad y el endotelio sobre las respuestas contráctiles inducidas por el agonista de  $\text{Ca}^{2+}$ , BAY K 8644, se realizaron curvas concentración-respuesta ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) a este fármaco en segmentos aórticos con y sin endotelio procedentes de ratas SHR y WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. Las curvas concentración-respuesta se realizaron en segmentos en situación basal o parcialmente despolarizados con  $\text{K}^+$  15 mM. Esta concentración de  $\text{K}^+$  apenas modificó el tono contráctil. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto a la contracción previa inducida por  $\text{K}^+$  75 mM, cuyos valores medios para cada cepa y edad aparecen en la Tabla 6.

#### **3.1.- Influencia del grado de despolarización de las arterias sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644**

Cuando los segmentos arteriales poseían endotelio, los resultados fueron distintos si se trataba de la cepa SHR o WKY. Así, en las SHR no se observaron diferencias significativas en la respuesta contráctil del BAY K 8644 a ninguna de las edades entre los segmentos en situación basal y los parcialmente despolarizados con  $\text{K}^+$  15 mM. Sin embargo en la cepa WKY, la exposición a  $\text{K}^+$  15 mM incrementó el efecto contráctil del BAY K 8644 que fue significativo a todas las edades, excepto a las 5 semanas (Figs. 28,29,30,31 y 32).

En ausencia de endotelio no se modificó básicamente la respuesta observada en presencia de endotelio en la cepa SHR. Sin embargo, en arterias desendotelizadas de ratas WKY, la despolarización previa con 15 mM de  $\text{K}^+$  incrementó la respuesta del BAY K 8644 sólo en los segmentos de 6 meses y 1 año y provocó una reducción a los 1,5 años (Figs. 28,29,30,31 y 32).

## 5 SEMANAS

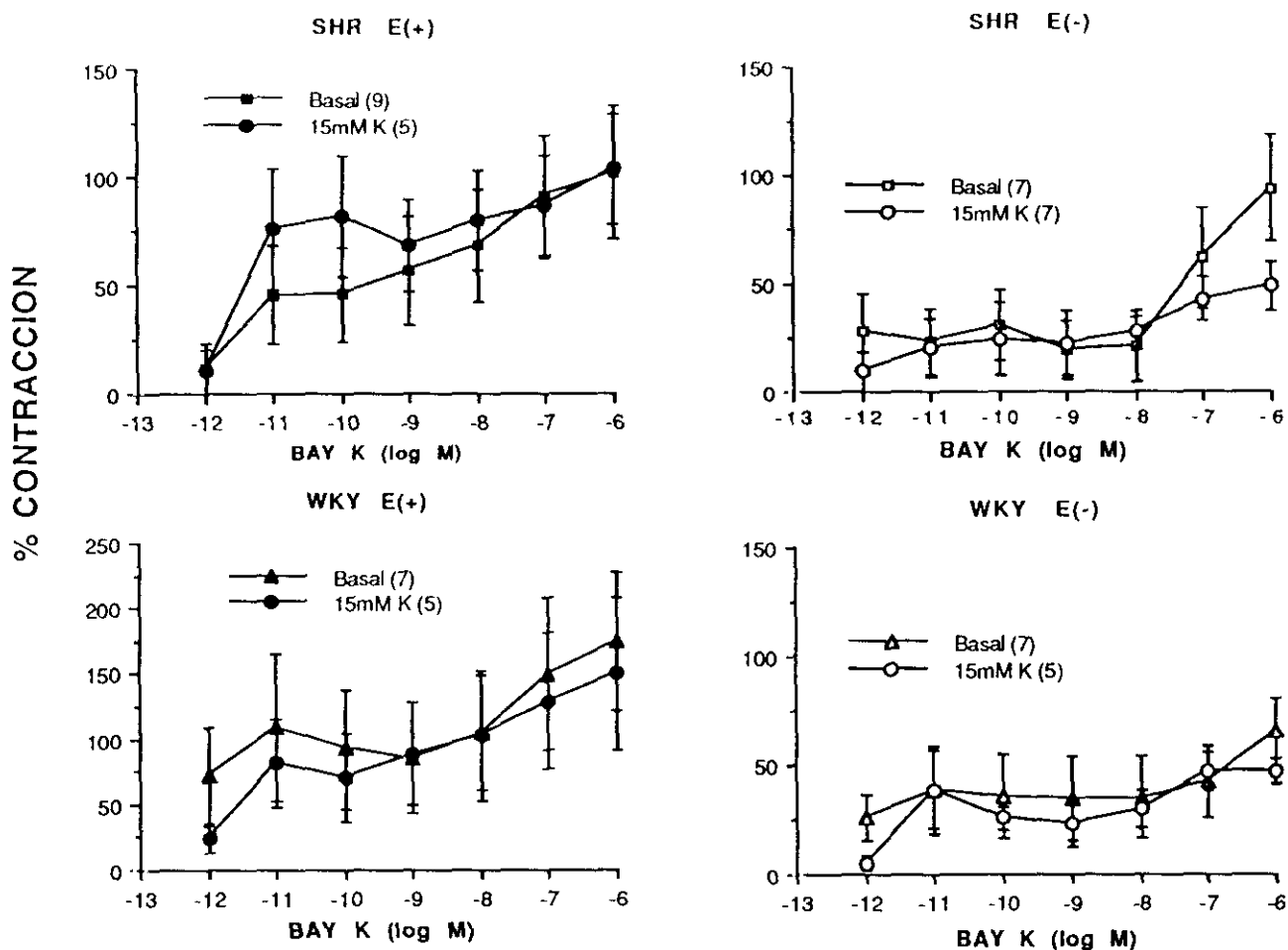
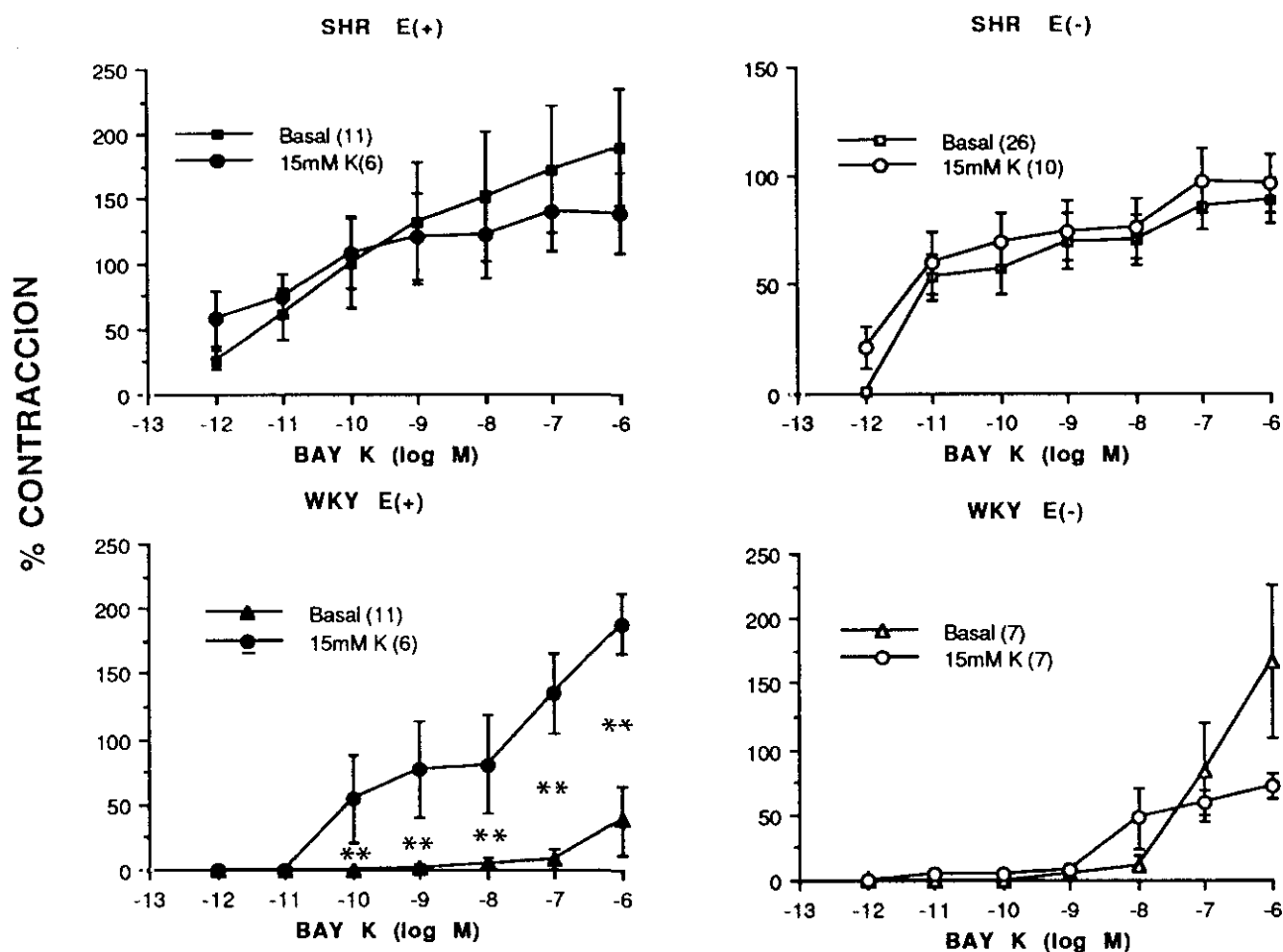


Fig. 28.- Efecto de la despolarización previa con una solución de  $K^+$  15 mM sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos de las cepas SHR y WKY con (E+) y sin endotelio (E-) de 5 semanas de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por una solución de  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos están reflejados en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media y entre paréntesis el número de segmentos utilizados.

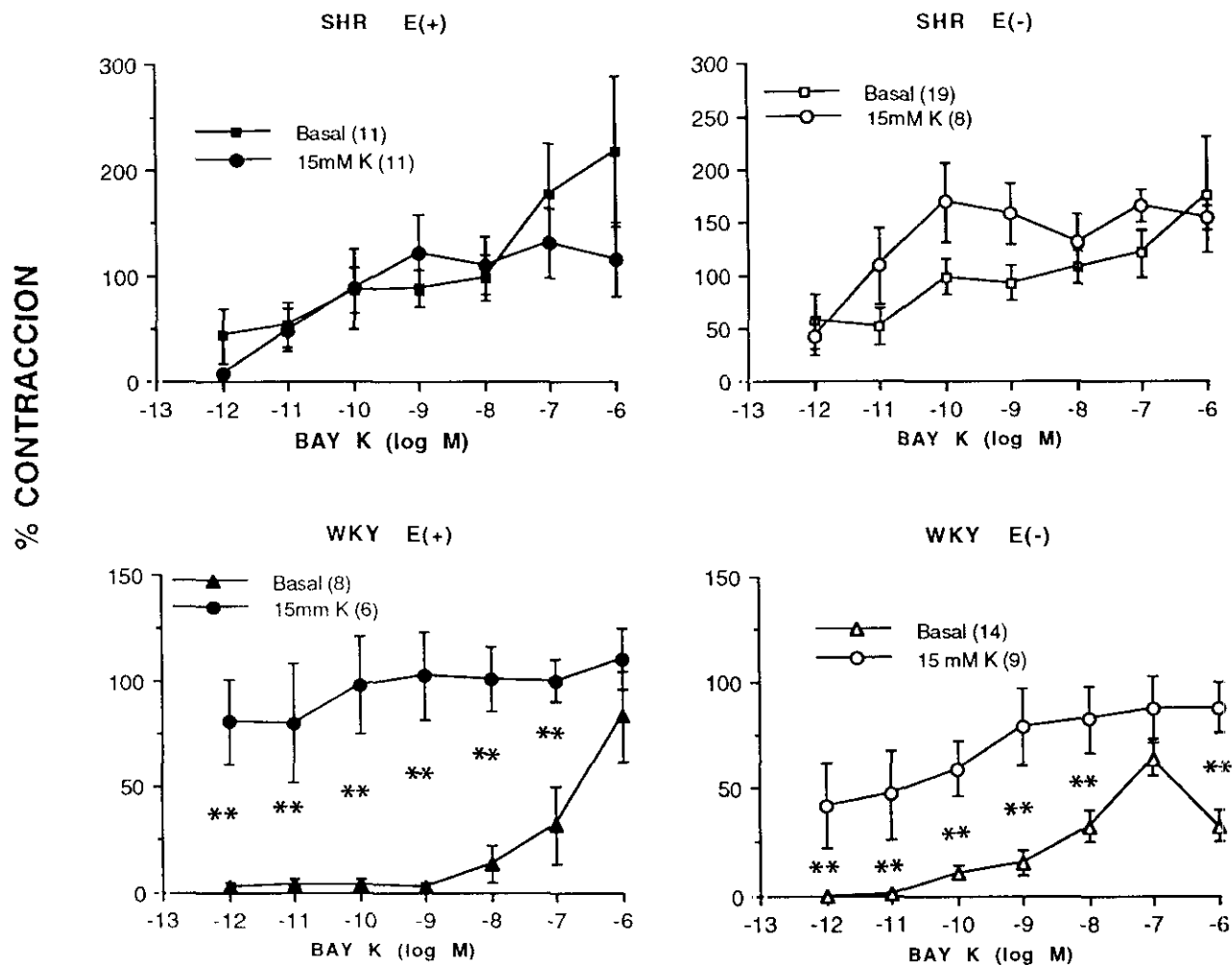


### 3 MESES



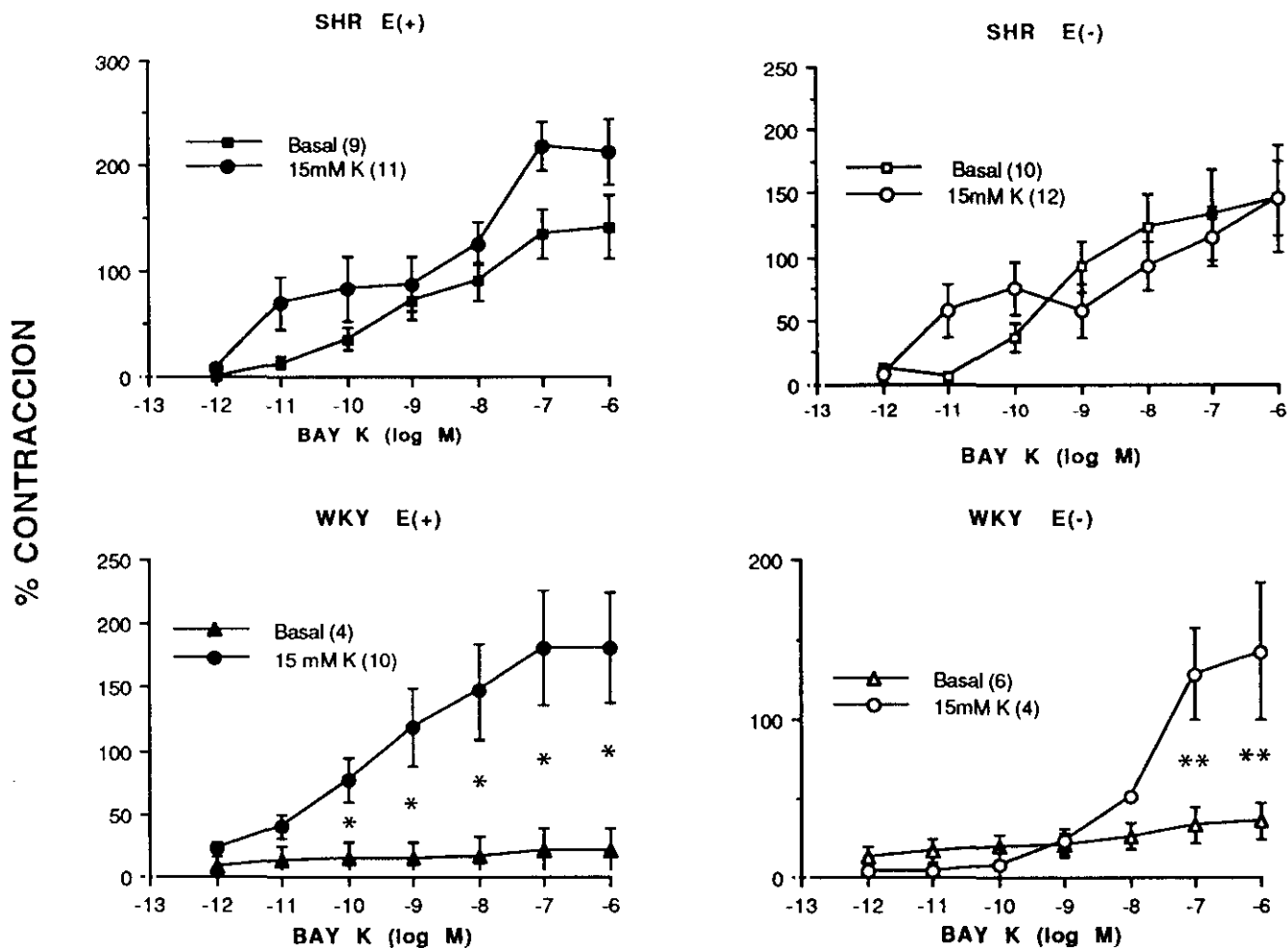
**Fig. 29.-** Efecto de la despolarización previa con una solución de  $K^+$  15 mM sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos de las cepas SHR y WKY con (E+) y sin endotelio (E-) de 3 meses de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por una solución de  $K^+$  75 mM, cuyos valores están reflejados en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media, entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*\*  $p < 0,02$ .

## 6 MESES

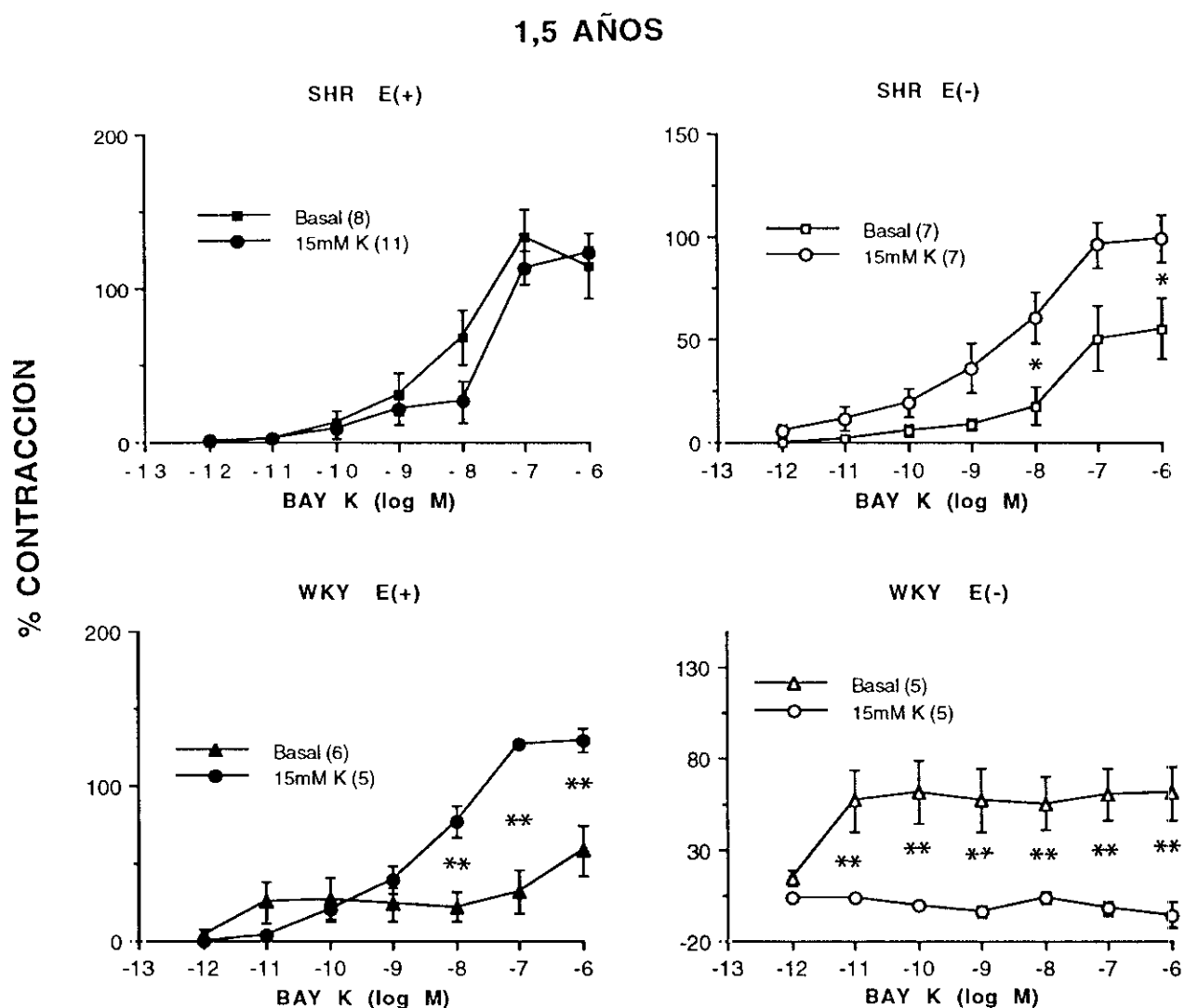


**Fig. 30.-** Efecto de la despolarización previa con una solución de  $K^+$  15 mM sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos aórticos de las cepas SHR y WKY con (E+) y sin endotelio (E-) de 6 meses de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por una solución de  $K^+$  75 mM, cuyos valores están reflejados para los distintos casos en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,02$ .

1 AÑO



**Fig. 31.-** Efecto de la despolarización previa con una solución de  $K^+$  15 mM sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos aórticos de las cepas SHR y WKY con (E+) y sin endotelio (E-) de 1 año de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por una solución de  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos están reflejados en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética, las barras verticales el error estándar de la media, entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



**Fig. 32.-** Efecto de la despolarización previa con  $K^+$  15 mM sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos aórticos de las cepas SHR y WKY con (E+) y sin (E-) endotelio de 1,5 años de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por una solución de  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos están reflejados en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética, las barras el error estándar de la media, entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

**Tabla 6.-** Valores en mg de las contracciones originadas por K<sup>+</sup> 75 mM en segmentos aórticos procedentes de ratas de la cepa SHR Y WKY de diferentes edades .

5 SEMANAS	SHR	E(+) 700 ± 158 (7)
		E(-) 1250 ± 191 (7)
	WKY	E(+) 712 ± 240 (6)
		E(-) 750 ± 362 (6) Φ
3 MESES	SHR	E(+) 1950 ± 100 (7) #
		E(-) 2200 ± 135 (13) #
	WKY	E(+) 1750 ± 210 (8) #
		E(-) 1100 ± 135 (13) Φ
6 MESES	SHR	E(+) 973 ± 87 (14)
		E(-) 1327 ± 103 (15)
	WKY	E(+) 1550 ± 236 (7) Φ
		E(-) 972 ± 165 (15) *
1 AÑO	SHR	E(+) 2100 ± 100 (9) #
		E(-) 1517 ± 110 (11) #
	WKY	E(+) 1410 ± 156 (7) Φ #
		E(-) 960 ± 174 (5) Φ
1,5 AÑOS	SHR	E(+) 930 ± 136 (10)
		E(-) 2100 ± 232 (9) *
	WKY	E(+) 820 ± 111 (5)
		E(-) 11213 ± 138 (5) Φ #

Entre paréntesis se indica el número de segmentos utilizados.

\*p < 0,05 entre segmentos arteriales con (E+) y sin endotelio (E-) para cada cepa y edad

Φ p < 0,05 entre cepas dentro de cada grupo de edad.

# p < 0,05 entre cada una de las edades y la de 5 semanas.

### **3.2.- Influencia de la cepa sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644.**

Para analizar la influencia de la cepa (WKY o SHR) sobre la respuesta a BAY K 8644 se compararon las curvas a este agonista de calcio realizadas en las diferentes condiciones experimentales.

#### **3.2.1.- Arterias en situación basal**

No se observaron diferencias entre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 en segmentos de ratas WKY y SHR de 5 semanas, tanto en segmentos arteriales con o sin endotelio (Fig. 33). Sin embargo, a los 3 meses, 6 meses y 1 año, el efecto contráctil de BAY K 8644 en las SHR con y sin endotelio fue mayor que en las ratas WKY, observándose esta mayor respuesta prácticamente a lo largo de toda la curva (Figs. 34,35 y 36).

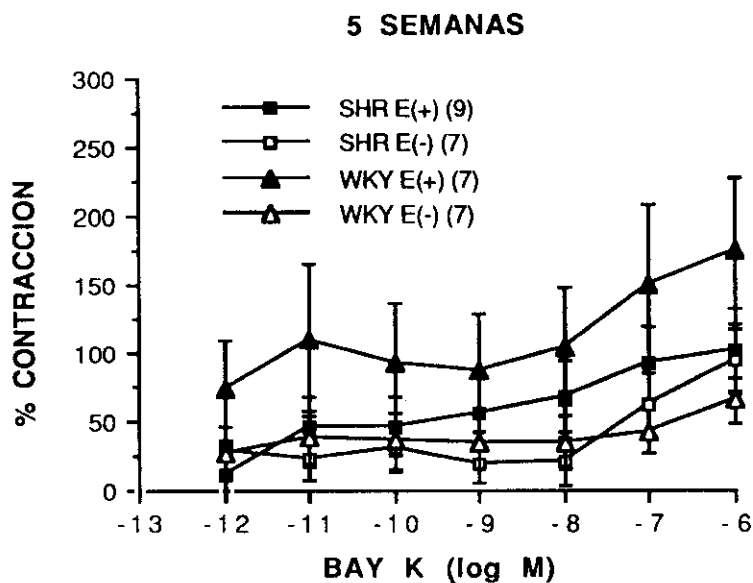
En las ratas de 1,5 años de edad, se observó un incremento de la respuesta a BAY K 8644 en segmentos de SHR con endotelio y en segmentos de ratas WKY sin endotelio, aunque en el primer caso el incremento ocurrió a concentraciones altas y en el segundo a concentraciones bajas (Fig. 37).

Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores en función de la edad, se observó que a las de 5 semanas, 3 meses, 6 meses y 1 año la respuesta vasoconstrictora inducida por el BAY K 8644 varió en función de la cepa. No ocurrió lo mismo al 1,5 años de edad, en donde no influyó el tipo de cepa en la respuesta inducida por el BAY K 8644, debido probablemente al carácter inverso de las diferencias en presencia y ausencia de endotelio (Tabla 7). Cuando se realizó el análisis de la varianza en los segmentos con y sin endotelio por separado, se observó que en ambos casos el efecto de este agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  era distinto en

función de la cepa (Tabla 7).

Por otra parte, a las edades de 1 año y 1,5 años y en la población completa de segmentos con endotelio, se observó una interacción con la concentración de fármaco, lo que indica que las variaciones encontradas en función de la cepa, son dependientes de la concentración de fármaco (Tabla 7).

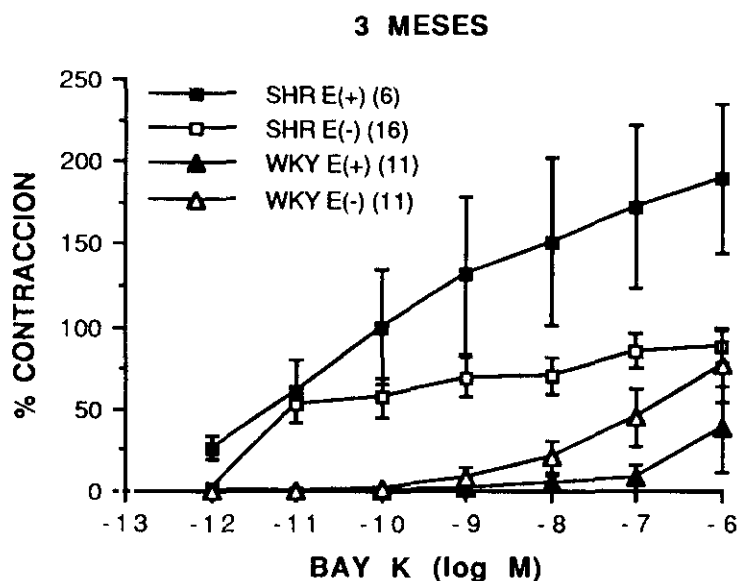
Estos resultados permiten concluir que el efecto vasoconstrictor originado por el BAY K 8644 en segmentos con y sin endotelio es distinto si los segmentos arteriales pertenecen a la cepa SHR o WKY.



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	11,5 ± 11	28,0 ± 17	72,2 ± 37	26,4 ± 10
-11	45,4 ± 22	23,4 ± 15	109,3 ± 56	38,1 ± 20
-10	45,9 ± 21	30,4 ± 16	92,2 ± 45	35,7 ± 19
-9	56,6 ± 25	19,3 ± 13	85,6 ± 43	34,2 ± 19
-8	67,9 ± 26	21,1 ± 16	104,7 ± 43	34,7 ± 18
-7	91,6 ± 28	61,2 ± 23	149,8 ± 58	42,1 ± 16
-6	102,3 ± 30	93,6 ± 24	174,4 ± 52	64,9 ± 16

**Fig. 33.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos de ratas con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 5 semanas de edad. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción en % de los inducidos por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados.

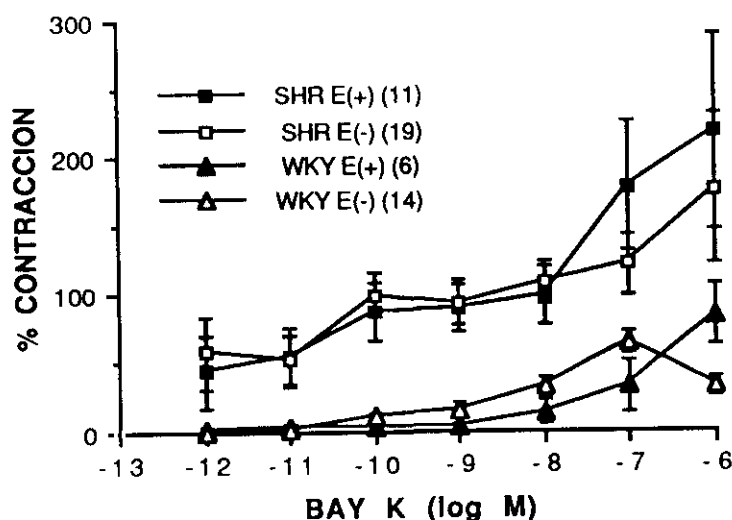




log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	26,4 ± 7	0 ± 0	0 ± 0 **	0,6 ± 0
-11	60,8 ± 18	52,7 ± 0	0 ± 0 **	0,6 ± 0 **
-10	99,8 ± 34	57,2 ± 12	0 ± 0 **	1,4 ± 0 **
-9	130,8 ± 46	69,6 ± 12	2 ± 2 **	8,7 ± 5 *
-8	151,3 ± 51	69,9 ± 11	4 ± 4 **	20,6 ± 9 **
-7	172,1 ± 49	85,4 ± 10	8 ± 8 **	45,0 ± 17 *
-6	188,8 ± 44	88,3 ± 10	38 ± 26 **	76,2 ± 21

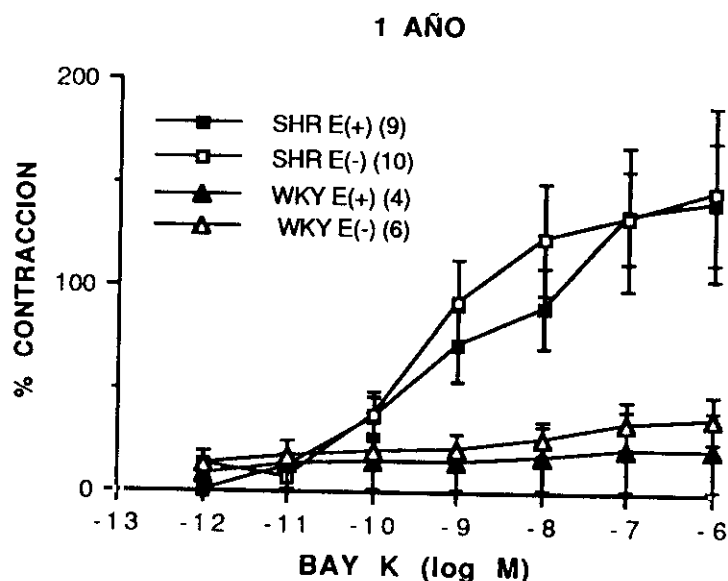
**Fig. 34.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 3 meses de edad. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de cada contracción en % de los inducidos por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada uno de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,02$

# 6 MESES



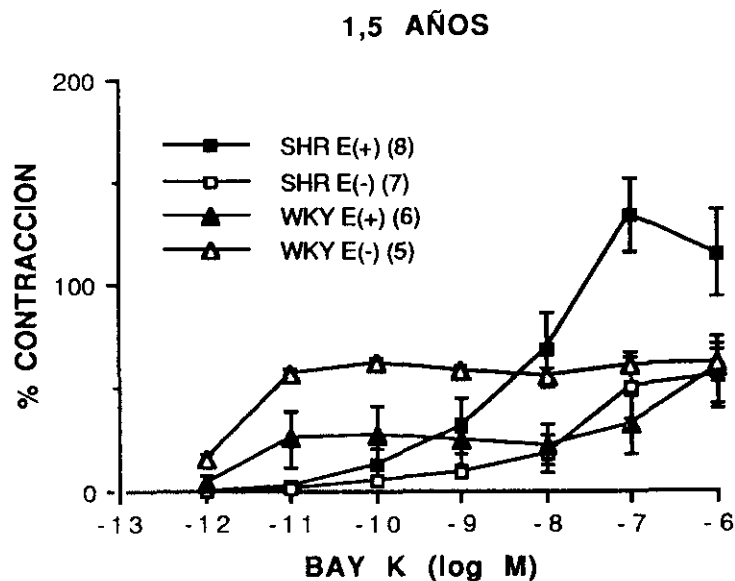
log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	43,3 ± 25	56,9 ± 26	2,4 ± 2 **	0,1 ± 0 **
-11	53,6 ± 21	51,8 ± 17	3,6 ± 3 **	1,2 ± 0 **
-10	86,5 ± 20	98,9 ± 16	3,6 ± 3 **	11 ± 6 *
-9	88,7 ± 17	92,8 ± 16	3 ± 2 **	15,2 ± 7 *
-8	97,7 ± 21	107,3 ± 15	13,7 ± 8 **	31,9 ± 20 *
-7	177,6 ± 47	120,2 ± 21	31,9 ± 18	63,3 ± 20 **
-6	217,3 ± 71	175,5 ± 55	83,3 ± 21	31,9 ± 20 **

**Fig. 35.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 6 meses de edad. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción en % de los inducidos por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	0,1 ± 0,0	13,2 ± 2	7,7 ± 7	12,9 ± 6
-11	11,4 ± 6	6,7 ± 3	12,5 ± 11	17,2 ± 7
-10	35,2 ± 11	37,0 ± 11	14,4 ± 13 *	18,8 ± 8
-9	71,2 ± 17	92,5 ± 20	14,4 ± 13 **	20,3 ± 8 *
-8	89,4 ± 19	122,9 ± 27	16,4 ± 15 **	26 ± 8 **
-7	134,0 ± 23	133,1 ± 35	20,2 ± 19 **	33 ± 11 **
-6	140,8 ± 29	145,6 ± 42	20,2 ± 19 **	36,4 ± 11 **

**Fig. 36.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1 año de edad. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción en % de los inducidos por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción en cada caso aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	0,4 ± 0	0,2 ± 0	4,2 ± 3	15,2 ± 4
-11	2,7 ± 1	1,6 ± 1	25,1 ± 13	57,0 ± 17 **
-10	13 ± 7	5,5 ± 3	27,1 ± 14	61,9 ± 17 **
-9	31 ± 13	8,9 ± 3	24,2 ± 11	57,2 ± 17 **
-8	67 ± 17	17,7 ± 9	22,4 ± 9 *	55,6 ± 15
-7	133,3 ± 18	50,3 ± 16	31,7 ± 14 **	60,6 ± 15
-6	114,4 ± 21	55,2 ± 15	58,6 ± 16 *	61,4 ± 15

**Fig. 37.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1,5 años de edad. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción en % de los inducidos por  $K^+$  75 mM y sus errores estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,02$ .

**Tabla 7.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (cepa y concentración de BAY K 8644) para cada una de las edades y en segmentos con (E+) y sin (E-) endotelio en situación basal o previamente expuestos a  $K^+$  15 mM.

	<u>CEPA</u>		<u>CEPA+</u> <u>CONCENTRACION</u>	
	Basal	$K^+$ 15 mM	Basal	$K^+$ 15 mM
<b>E(+)</b>	,0001	,0819	,0004	,6551
<b>E(-)</b>	,0001	,0001	,7673	,5598
<b>5 semanas</b>	,0189	,1354	,9891	,9876
<b>3 meses</b>	,0001	,0001	,1063	,9241
<b>6 meses</b>	,0001	,0002	,8066	,1128
<b>1 año</b>	,0001	,4869	,0006	,8277
<b>1,5 años</b>	,6513	,0568	,0002	,1209

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular del BAY K 8644 en la población experimental. El factor concentración dio siempre significativo.

### 3.2.2.- Arterias precontraídas con K<sup>+</sup> 15 mM

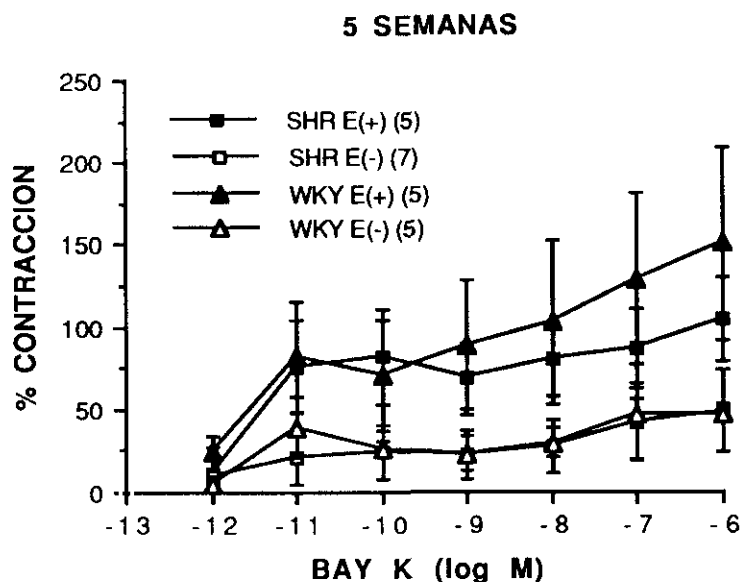
Antes de efectuar la curva concentración-respuesta a este fármaco se despolarizaron previamente los segmentos arteriales con una solución de K<sup>+</sup> 15 mM.

La administración de BAY K 8644 en segmentos procedentes de ratas WKY o SHR de diferentes edades expuestos a una solución de K<sup>+</sup> 15 mM produjo respuestas contráctiles que fueron en general menores en la cepa WKY sobre todo cuando los segmentos carecían de endotelio. Las respuestas obtenidas con las primeras concentraciones de BAY K 8644 en segmentos arteriales con endotelio de ratas WKY de 3, 6 meses y 1 año fueron menores que las de las SHR pero en arterias de ratas de 5 semanas y 1,5 años no hubo diferencias entre las respuesta a éste agonista de calcio (Figs. 38,39,40,41 y 42).

Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores (cepa y concentración), en toda la población de arterias, se observó que el tipo de cepa a la que pertenecían los segmentos arteriales parcialmente despolarizados con 15 mM de K<sup>+</sup> influía en las respuestas vasculares del BAY K 8644 sólo en segmentos sin endotelio (Tabla 7).

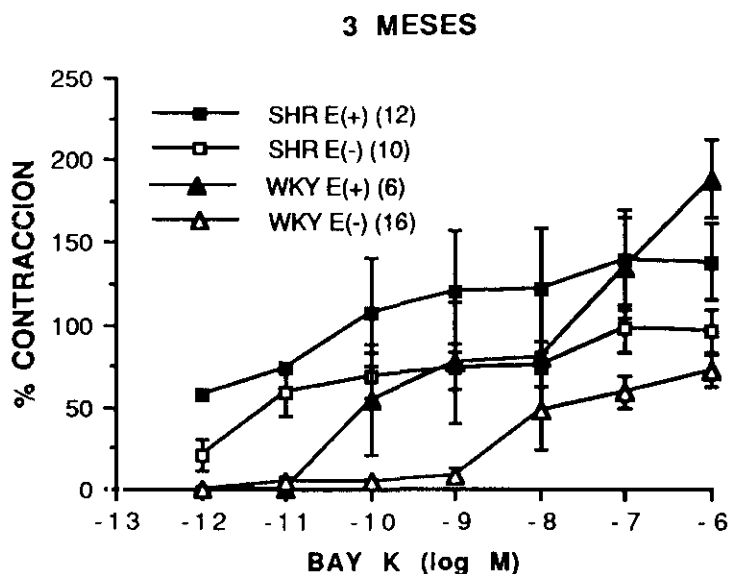
Este análisis de la varianza referido a la edad indica que sólo cuando las ratas tenían 3 y 6 meses de edad, la cepa a la que pertenecían los segmentos arteriales podía determinar una respuesta vascular diferente al BAY K 8644 en los segmentos previamente despolarizados con K<sup>+</sup> 15 mM (Tabla 7).

De estos resultados se puede concluir que la respuesta del BAY K 8644 en segmentos sin endotelio previamente expuestos a 15 mM de K<sup>+</sup> es dependiente de la cepa a que pertenezcan.



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	10,4 ± 10	9,3 ± 9	23,3 ± 9	5,2 ± 3
-11	76,1 ± 28	20,2 ± 13	82,1 ± 33	38,9 ± 18
-10	81,6 ± 28	24,3 ± 16	70,1 ± 33	25,6 ± 5
-9	68,3 ± 21	22,3 ± 15	88,9 ± 39	22,8 ± 10
-8	79,9 ± 22	27,4 ± 7	102,6 ± 49	29,6 ± 9
-7	86,4 ± 23	42,4 ± 10	128,8 ± 52	46,7 ± 8
-6	103,4 ± 25	48,8 ± 11	149,9 ± 58	47,1 ± 6

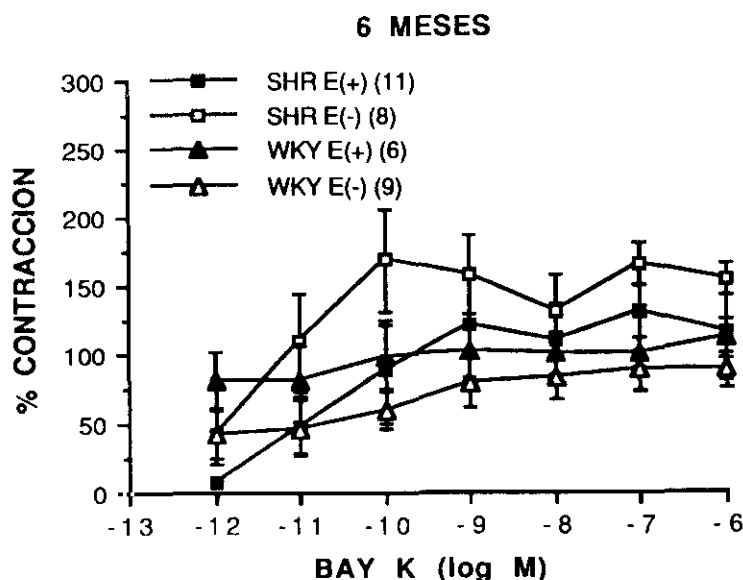
**Fig. 38.-** Curva concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 5 semanas de edad. Los segmentos se expusieron previamente a la realización de la curva concentración-respuesta a una solución de  $K^+$  15 mM. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción en % de respuesta inducida por una solución de  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados.



log M	SHR E(+)	SHR E(-)	WKY E(+)	WKY E(-)
-12	57,4 ± 21	21,2 ± 9	0,1 ± 0 *	0,6 ± 0 *
-11	74,3 ± 17	59,2 ± 14	0,1 ± 0 *	4,4 ± 2 *
-10	107,7 ± 28	69,2 ± 14	54,5 ± 32	4,7 ± 1 *
-9	120,3 ± 33	74,3 ± 14	76,4 ± 37	8,8 ± 3 *
-8	121,4 ± 33	75,7 ± 14	80,7 ± 37	47,4 ± 23 *
-7	139,6 ± 31	97,6 ± 15	134,2 ± 30	59,6 ± 9 *
-6	138,6 ± 31	96,3 ± 13	187,9 ± 23	72,7 ± 9 *

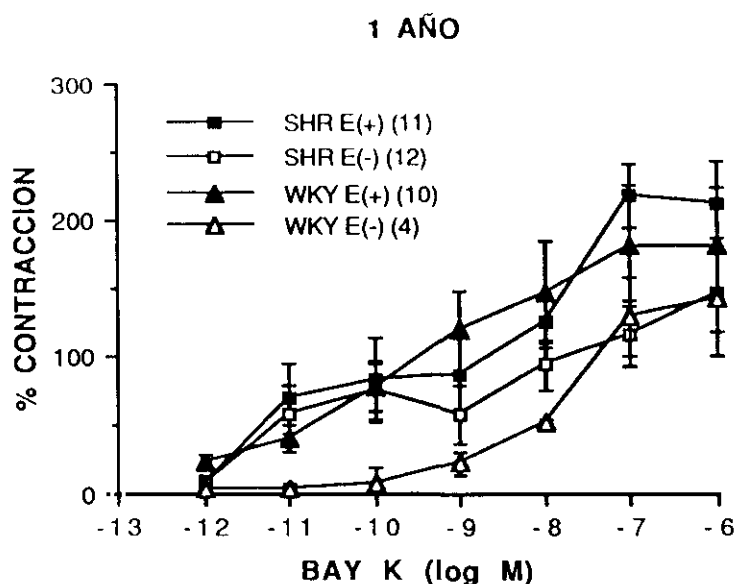
**Fig. 39.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 3 meses de edad. Los segmentos se expusieron previamente a la realización de la curva concentración-respuesta a una solución de  $K^+$  15 mM. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de cada contracción en % de la respuesta inducida por una solución de  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,02$ .





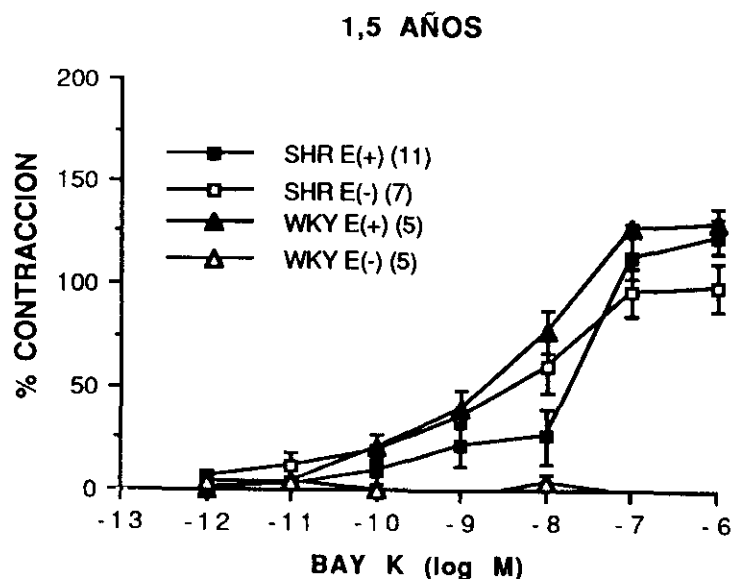
log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	7,4 ± 3	42,9 ± 17	80,7 ± 20 **	41,5 ± 19
-11	48,7 ± 19	109,0 ± 35	80,1 ± 28	46,8 ± 20 *
-10	88,0 ± 37	168,7 ± 38	98,2 ± 23	59,0 ± 13 **
-9	121,0 ± 37	158,4 ± 28	102,5 ± 21	79 ± 18 **
-8	109,4 ± 27	131,3 ± 26	100,6 ± 15	82,3 ± 15 **
-7	130,9 ± 33	165,5 ± 15	100,3 ± 10	87,6 ± 15 **
-6	115,7 ± 35	154,0 ± 11	110,9 ± 14	87,8 ± 12 **

**Fig. 40.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 6 meses de edad. Los segmentos se expusieron previamente a la realización de la curva concentración-respuesta a una solución de  $K^+$  15 mM. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de cada contracción en % de la respuesta inducida por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	7,3 ± 3	7,4 ± 5	22,2 ± 5	3,6 ± 3
-11	70,0 ± 25	58,3 ± 20	40,6 ± 9	3,7 ± 3 *
-10	83,1 ± 30	75,4 ± 21	76,6 ± 17	8,1 ± 1 *
-9	87,4 ± 25	58,3 ± 21	118,3 ± 30	22,5 ± 8
-8	125,8 ± 20	93,3 ± 19	146,9 ± 37	52 ± 2 *
-7	217,4 ± 24	116,1 ± 24	181,1 ± 44	128,6 ± 28
-6	211,9 ± 31	146,2 ± 28	181,0 ± 42	142,8 ± 42

**Fig. 41.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1 año de edad. Los segmentos se expusieron previamente a la realización de la curva concentración-respuesta a una solución de  $K^+$  15 mM. En la tabla inferior de la figura, se especifican los valores medios de contracción en % de la respuesta inducida por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,02$



log M	SHR E(+)	SHR(E-)	WKY(E+)	WKY(E-)
-12	1,3 ± 0	6,0 ± 3	0,2 ± 0	3,6 ± 2
-11	3,17 ± 1	11,5 ± 6	4,2 ± 1	3,6 ± 2
-10	8,8 ± 6	19,3 ± 7	20,6 ± 7	-0,0 ± 2 *
-9	22,1 ± 10	35,9 ± 12	39,8 ± 9	-3,6 ± 3 **
-8	36,4 ± 13	60,1 ± 12	77,1 ± 9	4,0 ± 3 **
-7	113,2 ± 11	96,0 ± 11	127,3 ± 2	-1,8 ± 3 **
-6	123,6 ± 8	98,8 ± 11	129,4 ± 7	-5,5 ± 7 **

**Fig. 42.-** Curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin endotelio (E-) procedentes de las cepas SHR y WKY de 1,5 años de edad. Los segmentos se expusieron previamente a la realización de la curva concentración-respuesta a una solución de  $K^+$  15 mM. En la tabla inferior de la figura se especifican los valores medios de contracción en % de la respuesta inducida por  $K^+$  75 mM y el error estándar para cada una de las concentraciones de BAY K 8644. Los valores medios de dicha contracción y el error estándar aparecen en la Tabla 6. Entre paréntesis se especifica el número de segmentos arteriales utilizados. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre la cepa WKY y SHR cuando los segmentos arteriales tenían o no endotelio. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

### **3.3- Influencia de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644**

Con el fin de estudiar la influencia de la edad sobre las respuestas vasoconstrictoras a BAY K 8644 se compararon mediante la t de Student las respuestas a las distintas edades con respecto a las obtenidas a las 5 semanas para cada concentración de fármaco y en cada situación experimental (cepa SHR o WKY arterias en situación basal o expuestas a  $K^+$  15mM, arterias con y sin endotelio). Además, se analizaron de forma global los resultados a todas las concentraciones de BAY K 8644 en cada grupo experimental por análisis de la varianza de dos factores (edad del animal y concentración de fármaco).

#### **3.3.1.- Arterias en situación basal**

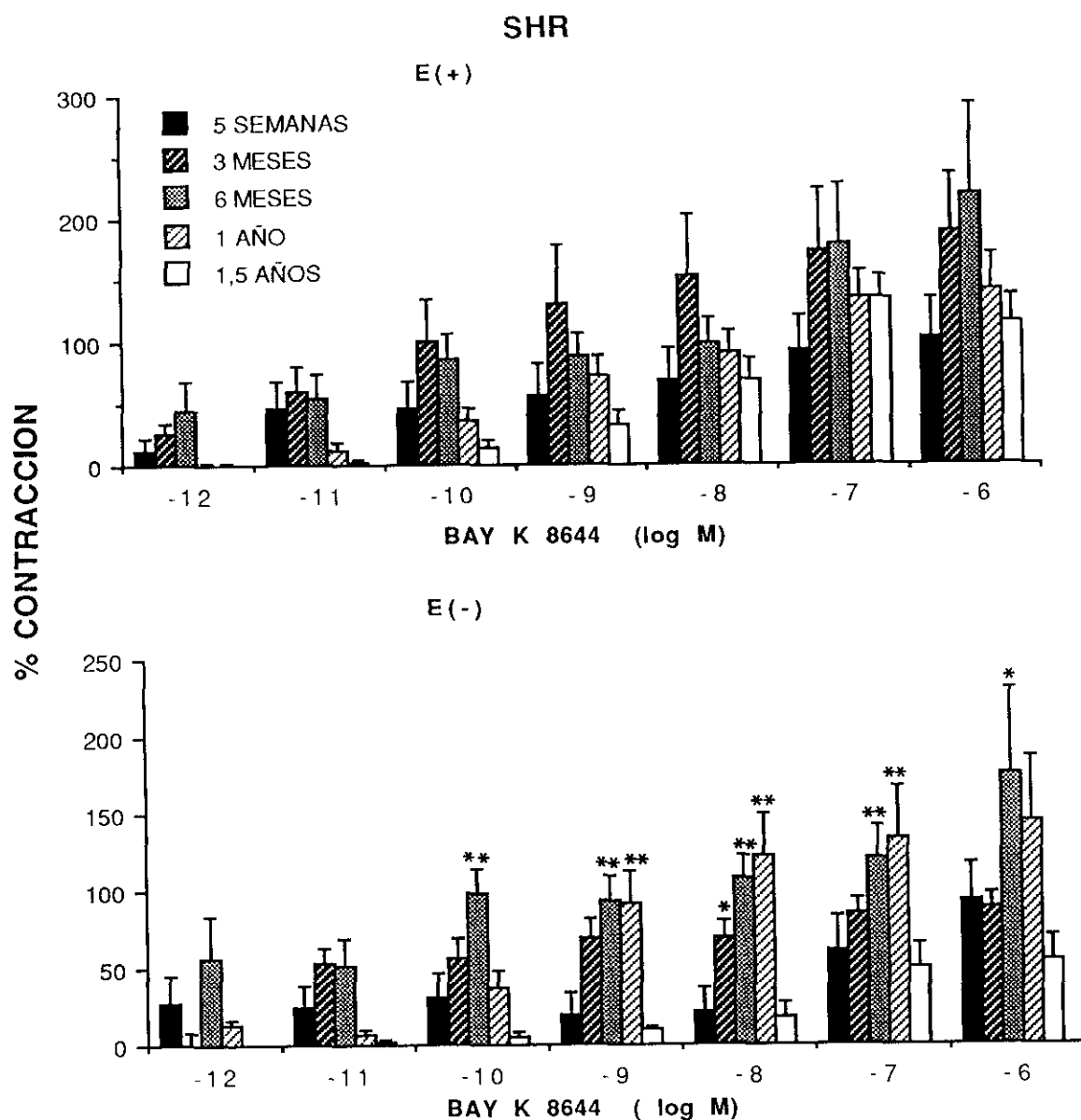
Las respuestas obtenidas por el BAY K 8644 en segmentos con endotelio pertenecientes a la cepa SHR tendieron a incrementarse con la edad hasta los 6 meses. Sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes de las observadas a las 5 semanas a ninguna de las edades (Fig. 43).

En segmentos sin endotelio, de la cepa SHR, se observó un aumento de las respuestas contráctiles a BAY K 8644 obtenidas a los 6 meses y 1 año con respecto a las observadas a las 5 semanas (Fig. 43). El grupo de más edad (1,5 años), presentó un efecto vasconstrictor muy bajo (Fig. 37).

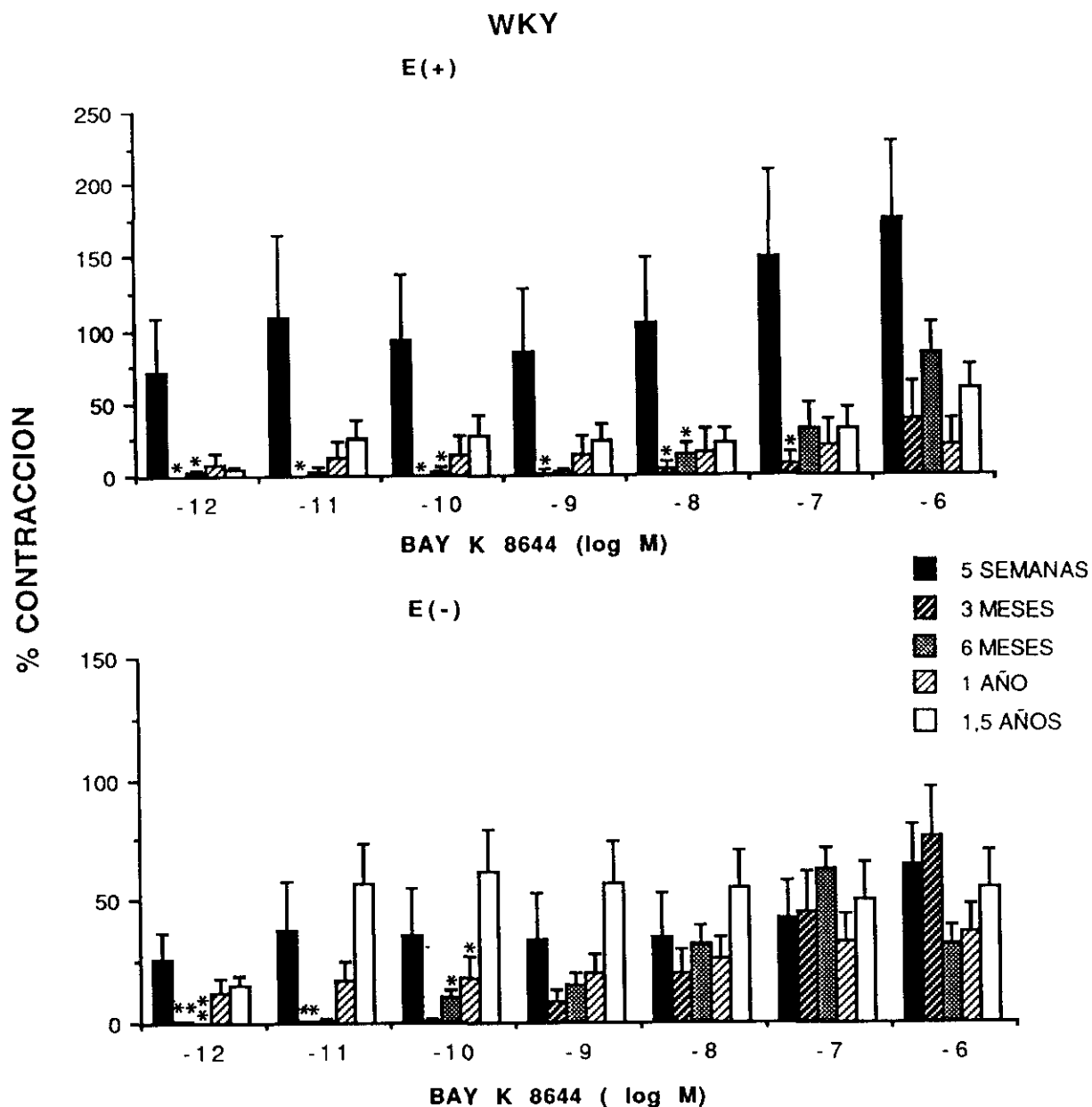
El análisis de la varianza de dos factores mostró que en las arterias de la cepa SHR con o sin endotelio, la edad influye significativamente en el efecto vasoconstrictor del BAY K 8644 (Tabla 8).

Los resultados encontrados en la cepa WKY fueron diferentes a los observados en la cepa SHR. Así, en segmentos aórticos con endotelio la respuesta inducida por el BAY K 8644 en arterias de 5 semanas fue superior (aunque en algunos casos no estadísticamente significativo) a la observada en segmentos del resto de las edades. A los 3 meses, es donde se presentan diferencias significativas a lo largo de toda la curva concentración-respuesta (Fig. 44). En segmentos sin endotelio solo se encontraron diferencias significativas entre las respuestas inducidas por concentraciones bajas de BAY K 8644 entre los segmentos de diferentes edades respecto a los de 5 semanas (Fig. 44).

El análisis de la varianza de dos factores dió como resultado que en los segmentos con o sin endotelio de la cepa WKY, la edad es un factor que influye en las respuestas originadas por este agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 8).



**Fig. 43.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por  $K^+$  75 mM cuyos valores están reflejados para los distintos casos en la Tabla 6. Cada histograma representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 5 y 16. Los asteriscos representan la significancia entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .



**Fig. 44.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por  $K^+$  75 mM cuyos valores para los distintos casos están reflejados en la Tabla 6. Cada histograma representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 4 y 14. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

**Tabla 8.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (edad y concentración de BAY K 8644) para cada una de las cepas con (E+) y sin endotelio (E-) en situación basal y cuando los segmentos previamente se expusieron a K<sup>+</sup> 15 mM.

	<u>EDAD</u>		<u>EDAD + CONCENTRACION</u>	
	Basal	15 mM K <sup>+</sup>	Basal	15 mM K <sup>+</sup>
<b>SHR (+)</b>	,0001	,0001	,9900	,4568
<b>SHR (-)</b>	,0001	,0001	,7028	,9410
<b>WKY (+)</b>	,0001	,1911	,9999	,1340
<b>WKY (-)</b>	,0070	,0001	,9367	,5720

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular del BAY K 8644 en la población experimental. El factor concentración dio siempre significativo.



### **3.3.2.- Arterias precontraídas con K<sup>+</sup> 15 mM**

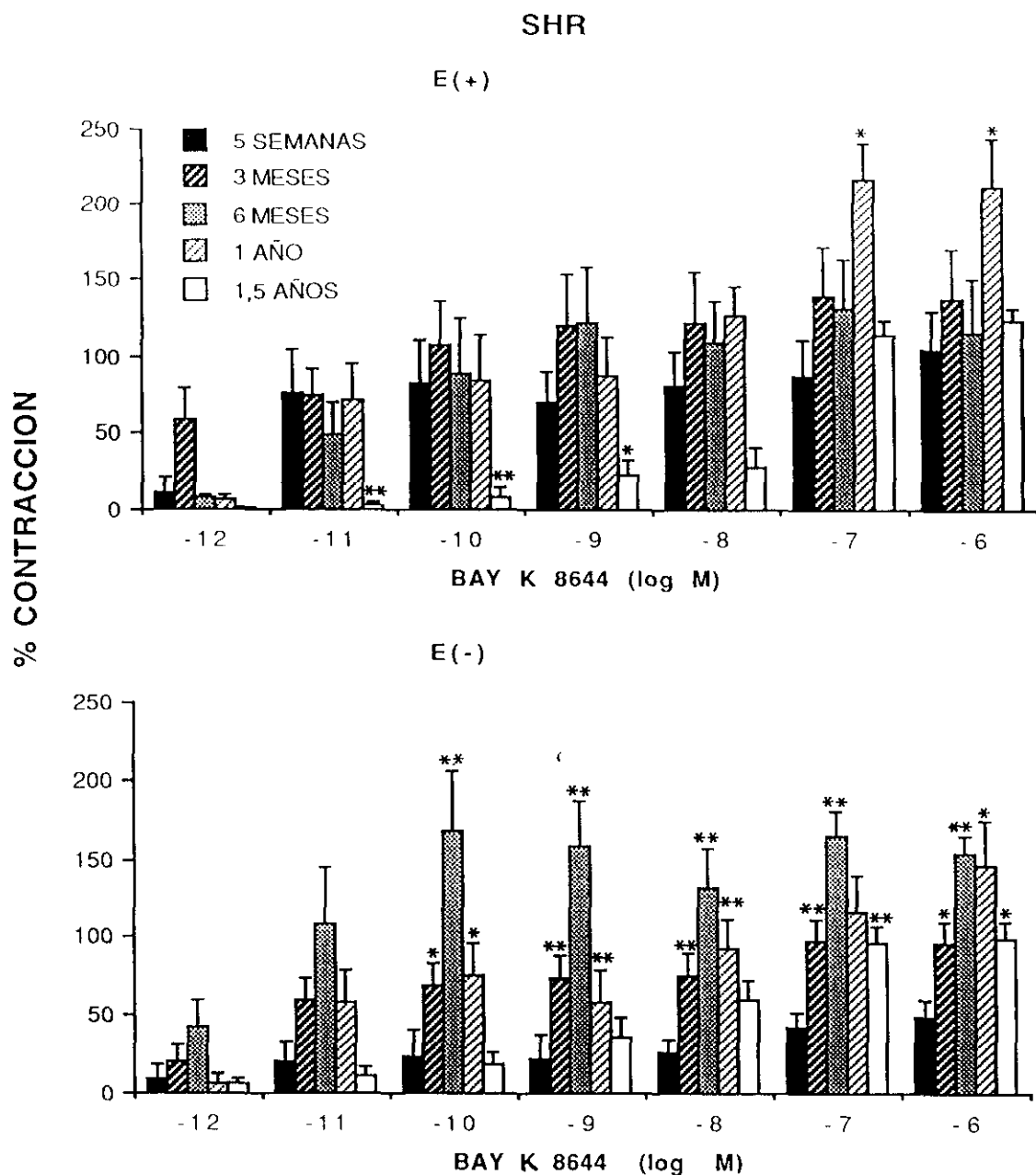
Cuando se realizaron las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 en segmentos de las cepas WKY y SHR con o sin endotelio previamente expuestos a K<sup>+</sup> 15 mM, los resultados obtenidos en función de la edad están representados en las Figs. 45 y 46.

El efecto producido por el BAY K 8644 en segmentos con endotelio de la cepa SHR, prácticamente fue igual a todas las edades. Sólo se observaron incrementos significativos en la respuesta al año y a concentraciones altas ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) y reducciones en arterias de 1,5 años y a las concentraciones de  $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  M comparadas con las obtenidas a las 5 semanas (Fig. 45). En segmentos sin endotelio de la misma cepa se observó en general un incremento de la respuesta a BAY K 8644 a los 3 meses, 6 meses y 1 año con respecto a la de 5 semanas. También se observó este fenómeno en las arterias de 1,5 años, pero a concentraciones altas del agonista de calcio (Fig. 45).

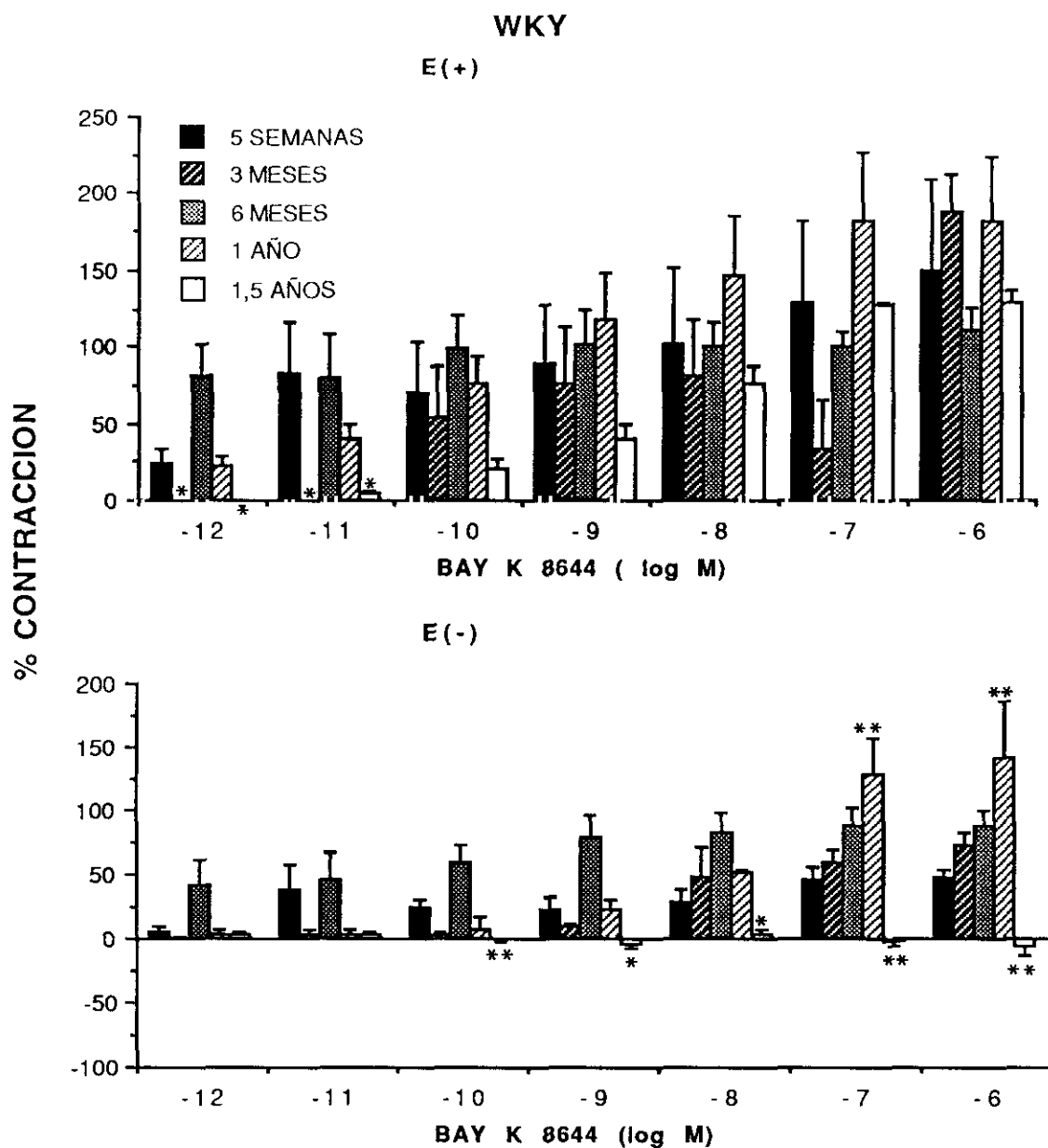
En segmentos de la cepa WKY con endotelio, prácticamente no hubo diferencias en la contracción originada por el BAY K 8644 en función de la edad. Sólo a dosis bajas ( $10^{-12}$  a  $10^{-10}$  M) y en segmentos de 3 meses y 1,5 años de edad, se observó un efecto contráctil menor que al obtenido a las 5 semanas (Fig. 46). Cuando se le suprimió el endotelio, a los segmentos de la misma cepa, se observaron aumentos a concentraciones altas y reducciones de la respuesta al agonista a las edades de 1 año y 1,5 años, respectivamente, con respecto a los segmentos de 5 semanas (Fig. 46).

El análisis de la varianza de dos factores (edad y concentración) muestra que la edad influye en la respuesta vascular del BAY K 8644 en segmentos con y sin endotelio expuestos a una solución de K<sup>+</sup> 15 mM (Tabla 8). Sin embargo, en la cepa

WKY, la edad del animal sólo influye en la respuesta al BAY K 8644 en los segmentos sin endotelio.



**Fig. 45.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$ -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los segmentos previamente se expusieron a una solución de  $K^+$  15 mM. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos están reflejados en la Tabla 6. Cada histograma representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 5 y 12. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas.  
 \*  $p < 0,05$     \*\*  $p < 0,02$ .



**Fig. 46.-** Efecto de la edad sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos aórticos con (E+) y sin (E-) endotelio de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años de edad. Los segmentos previamente se expusieron a una solución de  $K^+$  15 mM. Los resultados están expresados en % de la contracción originada por  $K^+$  75 mM, cuyos valores están reflejados en la Tabla 6. Cada histograma representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. El número de segmentos arteriales utilizados en la realización de los experimentos estuvo comprendido entre 4 y 16. Los asteriscos representan la significancia estadística (t de Student) entre cada una de las edades respecto a la de 5 semanas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

### **3.4.- Influencia del endotelio sobre las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644.**

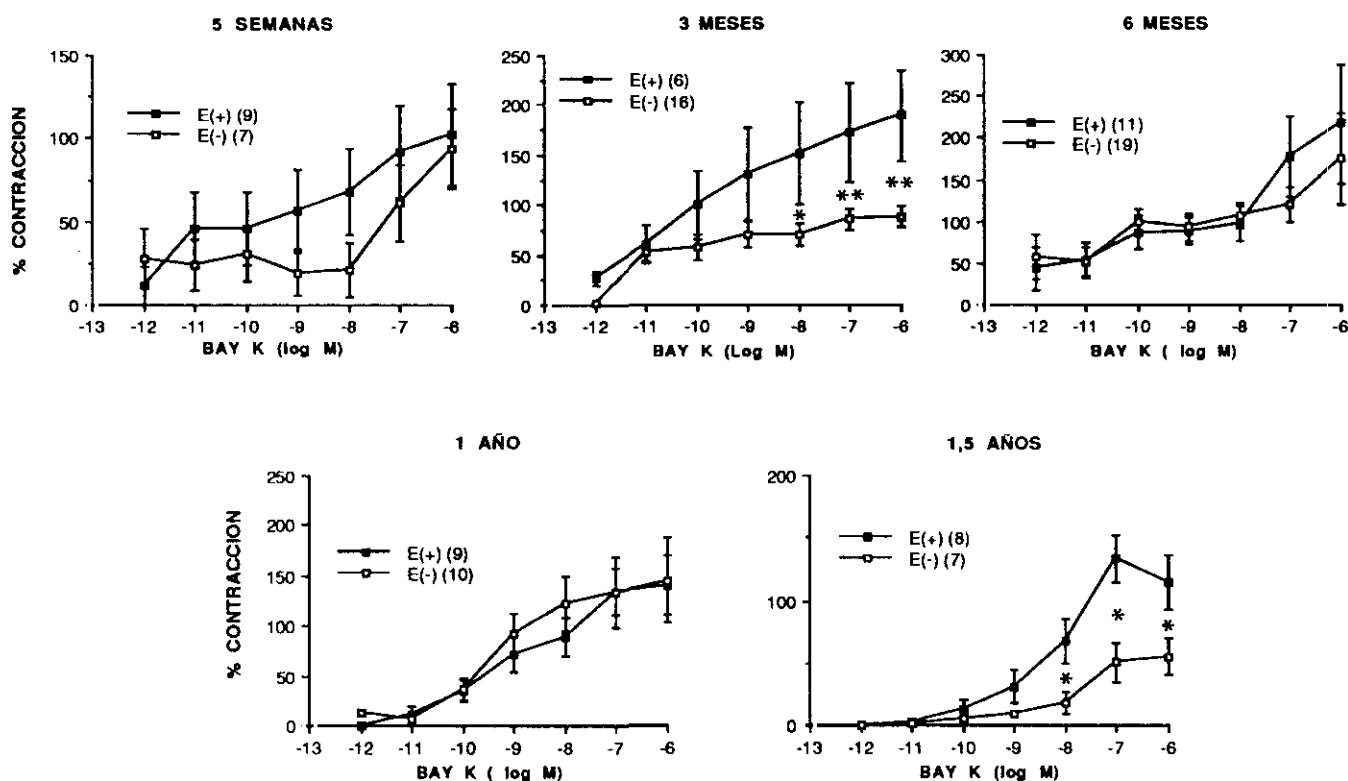
El estudio comparativo entre las diferentes respuestas a BAY K 8644 en segmentos de ratas WKY y SHR de diferentes edades está representado en las Figs. 47 y 48.

#### **3.4.1.- Arterias en situación basal**

En los segmentos arteriales procedentes de las cepas SHR o WKY no se ha observado, en general, diferencias significativas en función del endotelio en la respuesta inducida por el BAY K 8644. Tan sólo se ha observado en las ratas de 3 meses y 1,5 años de la cepa SHR una reducción de la contracción tras la retirada del endotelio a concentraciones altas de este agonista (Figs. 41 y 42).

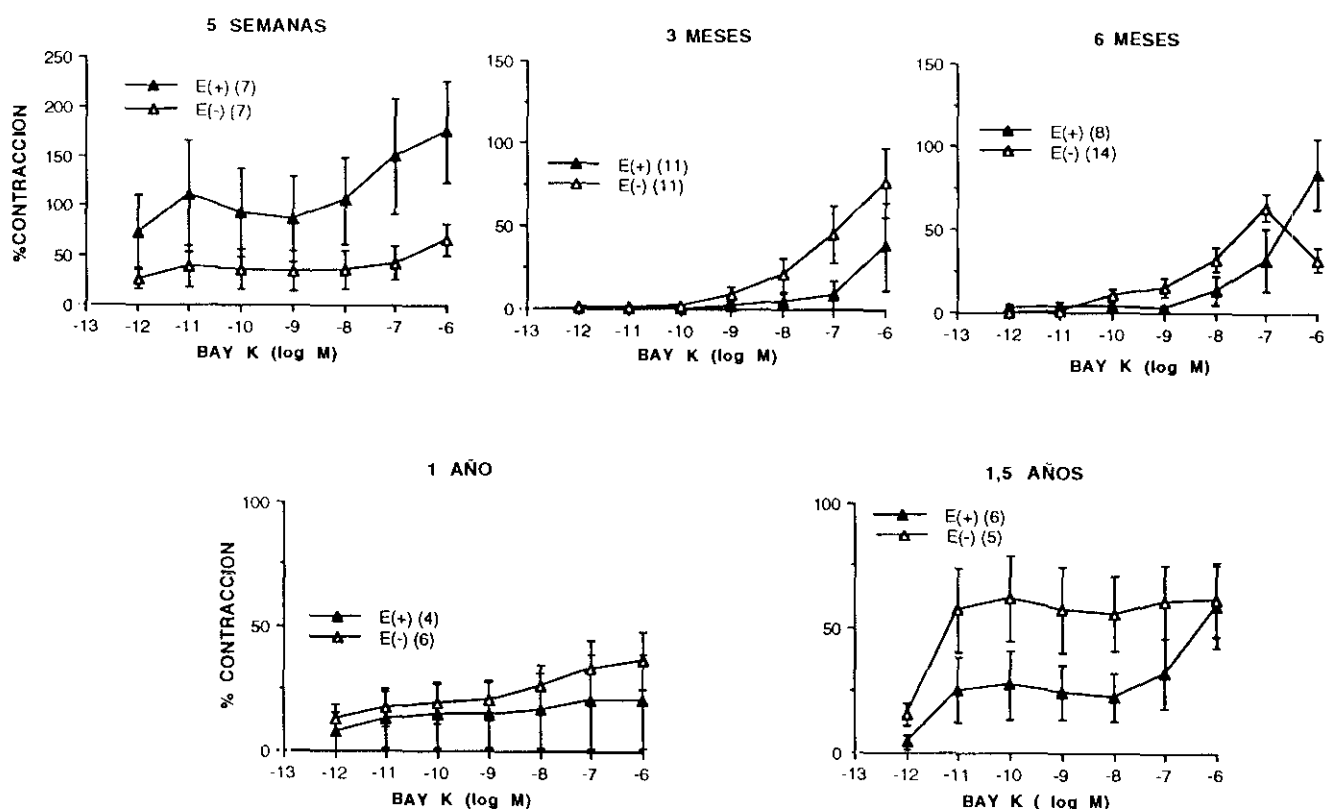
El análisis de la varianza de dos factores demostró que la presencia o no de endotelio influía en los efectos contráctiles del BAY K 8644 en las arterias de la cepa SHR pero no afectaba a las obtenidas en las de la cepa WKY (Tabla 9). Realizando el análisis de la varianza en función de la edad, se observó que el endotelio no influía en las respuestas del BAY K 8644 a ninguna de las edades.

# SHR



**Fig. 47.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 en segmentos aórticos procedentes de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. El BAY K 8644 se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M). Los resultados están expresados en % de la respuesta inducida por  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$ .

# WKY



**Fig. 48.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 en segmentos aórticos procedentes de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. El BAY K 8644 se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M). Los resultados están expresados como contracción respecto al % de la respuesta inducida por  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos utilizados.

**Tabla 9 .-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (**ANOVA**) de dos factores (endotelio y concentración de BAY K 8644) dentro de la misma cepa y para cada una de las edades en situación basal y cuando los segmentos previamente se expusieron a  $K^+$  15 mM.

	<u>ENDOTELIO</u>		<u>ENDOTELIO + CONCENTRACION</u>	
	Basal	15 mM $K^+$	Basal	15 mM $K^+$
<b>SHR</b>	<b>,0292</b>	<b>,1070</b>	<b>,1294</b>	<b>,1838</b>
<b>WKY</b>	<b>,8140</b>	<b>,0001</b>	<b>,2381</b>	<b>,0076</b>
<b>5 semanas</b>	<b>,5260</b>	<b>,0010</b>	<b>,8854</b>	<b>,6393</b>
<b>3 meses</b>	<b>,7901</b>	<b>,1921</b>	<b>,9426</b>	<b>,4234</b>
<b>6 meses</b>	<b>,7542</b>	<b>,2824</b>	<b>,7200</b>	<b>,9913</b>
<b>1 año</b>	<b>,1374</b>	<b>,0129</b>	<b>,2978</b>	<b>,0846</b>
<b>1,5 años</b>	<b>,2797</b>	<b>,0128</b>	<b>,2400</b>	<b>,0003</b>

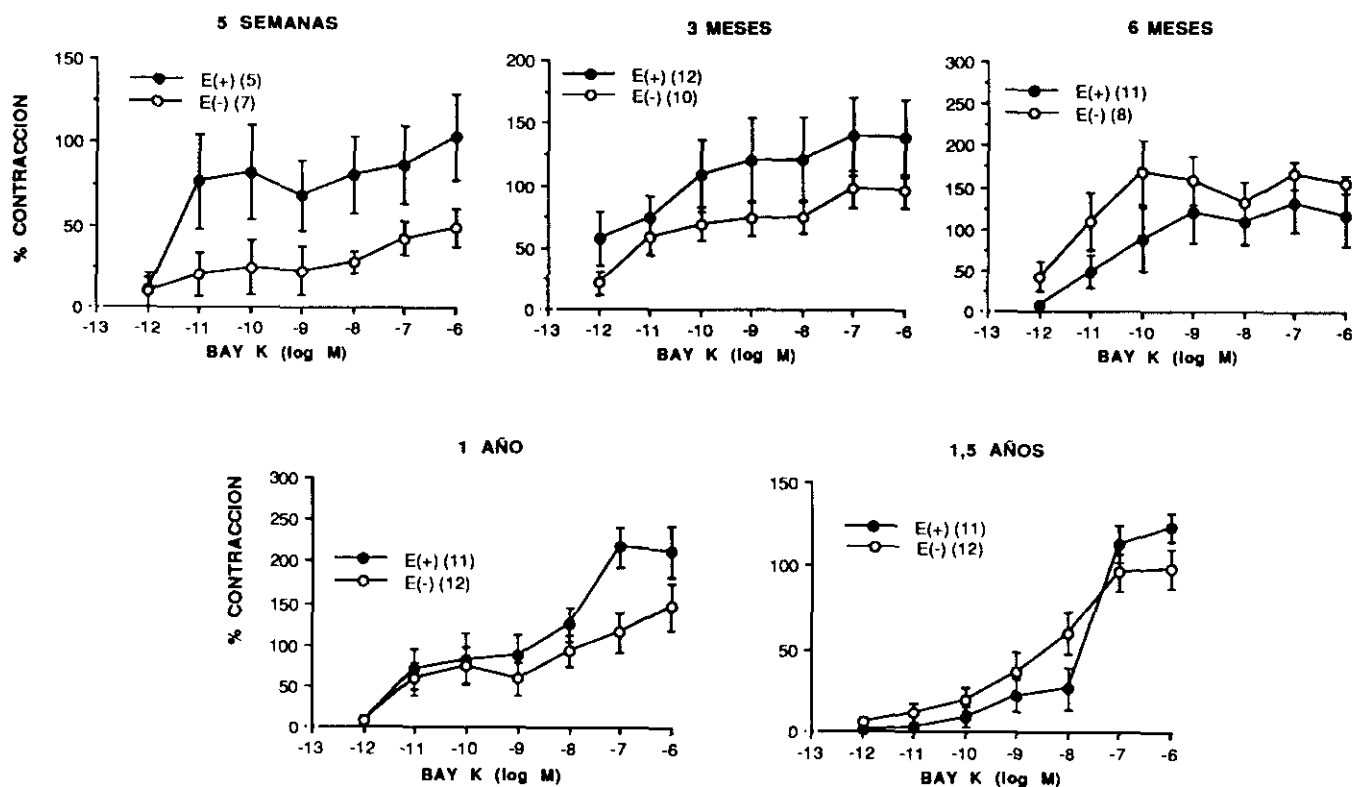
Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular del BAY K 8644. El factor concentración dio siempre significativo.



### **3.4.2.- Arterias precontraídas con $K^+$ 15 mM**

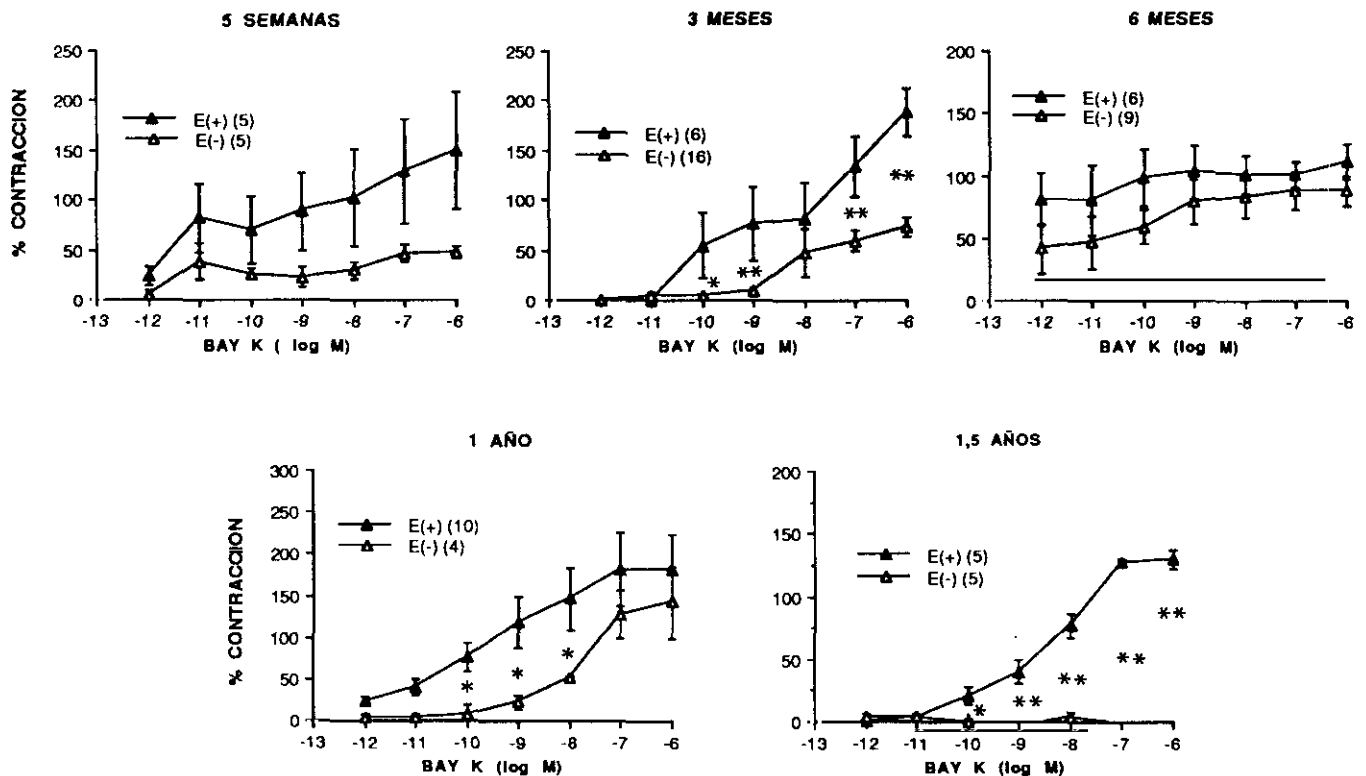
La respuesta contráctil inducida por BAY K 8644 en segmentos arteriales procedentes de la cepa SHR de todas las edades (5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años) fue similar en arterias con o sin endotelio (Fig. 49). Sin embargo, en arterias de ratas WKY el efecto contráctil del BAY K 8644 fue mayor en los segmentos con endotelio, aunque el aumento no fue significativo en segmentos de 5 semanas y 6 meses (Fig. 50). Estos resultados se ratificaron con el análisis de la varianza de dos factores (Tabla 9). Efectuando este análisis en función de la edad, se demostró que la presencia de endotelio en segmentos de 5 semanas, 1 año y 1,5 años modificaba la respuesta vasoconstrictora de este agonista (Tabla 9).

# SHR



**Fig. 49.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio (E-) sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 en segmentos aórticos procedentes de la cepa SHR de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. El BAY K 8644 se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M), después de la despolarización previa de los segmentos con una solución de  $K^+$  15 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por  $K^+$  75 mM, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$

# WKY



**Fig. 50.-** Efecto de la presencia (E+) o ausencia de endotelio E(-) sobre la curva concentración-respuesta a BAY K 8644 en segmentos aórticos procedentes de la cepa WKY de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años. El BAY K 8644 se administró en concentraciones crecientes y acumulativas ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M), después de la despolarización previa de los segmentos con  $K^+$  15 mM. Los resultados están expresados en % de la respuesta vasoconstrictora inducida por  $K^+$  75mM, cuyos valores para los distintos casos aparecen en la Tabla 6. Cada punto representa la media aritmética y las barras verticales el error estándar de la media. Entre paréntesis el número de segmentos utilizados y los asteriscos la significancia estadística (t de Student). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,02$

#### **4.- ESTUDIO ESTADISTICO DE LA POBLACION GLOBAL POR MEDIO DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE TRES FACTORES (ANOVA)**

Para analizar la influencia de cada uno de los parámetros objeto de estudio (endotelio, cepa y edad) sobre las respuestas a nifedipina o BAY K 8644 en el conjunto de la población, se realizó un análisis estadístico de la varianza de estos tres factores. Debido al gran volumen de datos, el análisis se tuvo que efectuar para cada concentración de fármaco. Se consideraron diferencias significativas para valores de  $p < 0,05$ .

En las tablas 10, 11, 12 y 13 se especifican los valores de  $p$  para cada concentración de nifedipina o BAY K 8644 en función de cada uno de los parámetros antes citados por separado o interrelacionando unos con otros.

##### **4.1.- Estudio de las curvas concentración-respuesta a nifedipina**

Como en los estudios anteriores, se analizaron los valores de las curvas concentración-respuesta en dos casos:

- 1.- Cuando se realizaron bajo un tono contráctil producido por una solución de  $K^+$  50 mM.
- 2.- Cuando el tono contráctil se indujo con una solución de NA  $10^{-7}$  M.

##### **4.1.1.- Arterias precontraídas con $K^+$ 50 mM**

La Tabla 10 muestra los valores de  $p$  obtenidos en el análisis de la varianza para cada una de las concentraciones y cuando las curvas concentración-respuesta a nifedipina se efectuaron en arterias previamente contraídas con  $K^+$  50 mM.

Los resultados obtenidos muestran que la *edad* es un factor determinante en las respuestas a nifedipina obtenidas en el conjunto de la población (ratas SHR o WKY con y sin endotelio), ya que se obtienen valores de  $p < 0,05$  para todas las concentraciones excepto para  $10^{-9}$  M. La *cepa* parece también influir, aunque en menor grado, en las respuestas producidas por este antagonista. Por el contrario, la presencia o no de *endotelio* no influyó de manera significativa excepto a las concentraciones de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M de nifedipina.

Si consideramos dos factores juntos:

1.- *El endotelio y la cepa*. Estos dos factores repercuten en las respuestas obtenidas, es decir, el hecho de que los segmentos tengan o no endotelio y pertenezcan a la cepa SHR o WKY hace que las curvas concentración-respuesta a este fármaco sean distintas.

2.- Lo mismo ocurre con la interacción entre *cepa* y *edad*, es decir, las diferencias encontradas entre las cepas van a ser diferentes en función de la edad.

3.- Por otra parte, al estudiar la interacción entre *endotelio* y *edad* nos encontramos con valores en general  $> 0,05$ , lo que indica que las diferencias encontradas a las distintas edades no están determinadas por la presencia o no de endotelio.

Cuando se estudian los *tres factores juntos* se obtienen diferencias significativas a las concentraciones de  $10^{-11}$  a  $10^{-8}$  M, lo que quiere decir, que los efectos diferentes observados en función de la edad a esas concentraciones van a depender de la cepa del animal y de si tienen o no endotelio.

**Tabla 10.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (endotelio, cepa y edad) individualmente e interrelacionados entre sí.

NIFEDIPINA (log M)							
	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6
CEPA(A)	,0007	,0001	,0107	,0322	,2052	,2945	,0136
ENDOTELIO(B)	,1414	,2706	,7869	,7736	,0036	,0048	,2094
EDAD (C)	,0058	,0004	,0034	,5492	,0001	,0001	,0001
AB	,0494	,0001	,0001	,0001	,0002	,0123	,1566
AC	,0003	,0001	,0001	,0001	,0001	,0001	,0001
BC	,0899	,0008	,0056	,1964	,0964	,3138	,8143
ABC	,4738	,0019	,0074	,0010	,0286	,4237	,9413

El análisis estadístico se ha realizado individualmente para cada una de las concentraciones de nifedipina empleadas en la curva concentración-respuesta cuando los segmentos arteriales habían sido contraídos previamente con  $K^+$  50 mM.

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular de la nifedipina.

#### 4.1.2.- Arterias precontraídas con NA $10^{-7}$ M

Los valores de  $p$  obtenidos mediante el análisis de la varianza cuando el tono contráctil se indujo con NA  $10^{-7}$  M antes de efectuar la curva concentración-respuesta a nifedipina, se especifican en la Tabla 11.

La *edad* de los animales influye en las respuestas vasculares obtenidas por la nifedipina en el conjunto de la población objeto de estudio. La presencia o no de *endotelio* influye significativamente en las respuestas vasodilatadoras a algunas dosis ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-7}$  M) de nifedipina. Sin embargo, la *cepa* no influye para nada en los resultados obtenidos teniendo en cuenta el conjunto de la población.

Cuando se consideran dos parámetros juntos de los anteriormente citados, se obtuvieron los siguientes resultados:

1.- La *cepa* y el *endotelio* no modifican las curvas concentración-respuesta a nifedipina.

2.- La *cepa* y la *edad*, si influyen en las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina en el conjunto de la población. Es decir, las diferencias que se encuentran en función de la edad van a depender de la *cepa*.

3.- El *endotelio* y la *edad* también son parámetros que modifican las respuestas vasculares del fármaco. Por tanto, las variaciones que se encuentran en función de la presencia o ausencia de *endotelio* dependen de la edad.

El análisis de la varianza teniendo en cuenta los tres parámetros juntos (*endotelio*, *cepa* y *edad*) indica que éstos no repercuten en las respuestas de la nifedipina sobre la población objeto de estudio, es decir, las diferencias encontradas para uno de los factores no son dependientes de los otros dos.

**Tabla 11.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (endotelio, cepa y edad) individualmente e interrelacionados entre sí.

NIFEDIPINA (log M)							
	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6
CEPA(A)	,7693	,7693	,5182	,1568	,8216	,4468	,2057
ENDOTELIO(B)	,1256	<b>,0170</b>	<b>,0001</b>	<b>,0013</b>	,2433	<b>,0467</b>	,3991
EDAD (C)	<b>,0032</b>	<b>,0031</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>
AB	,1575	,6242	,2919	,6273	,9186	,4932	,4868
AC	<b>,0003</b>	<b>,0034</b>	,1461	<b>,0166</b>	<b>,0079</b>	<b>,0002</b>	<b>,0066</b>
BC	<b>,0104</b>	<b>,0034</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0066</b>	<b>,0007</b>	<b>,0049</b>
ABC	,0730	,2354	,4711	,0892	,1562	,2082	,4246

El análisis estadístico se ha realizado individualmente para cada una de las concentraciones de nifedipina utilizadas en la curva concentración-respuesta cuando los segmentos arteriales habían sido contraídos previamente con  $NA\ 10^{-7}M$ .

Los valores de  $p < 0,05$  indican que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular de la nifedipina.



#### **4.2.- Estudio de las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644**

Al igual que en los casos anteriores, el análisis de la varianza de tres factores, se realizó en el conjunto de la población para cada concentración de BAY K 8644 y en los dos casos experimentales siguientes:

- 1.- Cuando las arterias estaban en situación basal.
- 2.- Exponiendo previamente los segmentos arteriales a una solución de  $K^+$  15 mM.

##### **4.2.1.- Arterias en situación basal**

Como se puede observar en la Tabla 12, la presencia o no de *endotelio* no influyó en la respuesta vasoconstrictora del BAY K 8644. La edad sólo influyó a las concentraciones  $10^{-12}$  y  $10^{-11}$  del fármaco y el tipo de cepa puede hacer variar la respuesta del BAY K 8644 a las concentraciones de  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$  M.

Al considerar dos factores juntos se obtuvieron las siguientes conclusiones:

*La cepa y el endotelio* no influyen en la respuesta a este fármaco, pero sí *la cepa y la edad* del animal a prácticamente todas las concentraciones ( $10^{-12}$ -  $10^{-7}$  M), lo que indica que las diferencias encontradas en la contracción del BAY K 8644 en función de la cepa va a depender de la edad del animal, pero no del endotelio. En cuanto a los valores encontrados para la interacción entre *endotelio y edad* lógicamente fueron  $> 0,05$ , teniendo en cuenta los valores encontrados para cada uno de los factores por separado

Cuando se analizó la interacción de los tres factores juntos (cepa, endotelio, y edad), no se encontró interacción significativa en las respuestas a este agonista de  $Ca^{2+}$ .

**Tabla 12.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (endotelio, cepa y edad) individualmente e interrelacionados entre sí.

BAY K 8644 (log M)							
	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6
CEPA(A)	,6930	,6706	<b>,0031</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>
ENDOTELIO(B)	,7827	,4731	,4860	,2339	,2878	,1607	,2129
EDAD (C)	<b>,0470</b>	<b>,0450</b>	,0979	,5507	,5276	,8799	,2240
AB	,5877	,9976	,5365	,1631	,1187	,0585	,8223
AC	<b>,0040</b>	<b>,0009</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0001</b>	<b>,0496</b>	,0794
BC	,8243	,2160	,1318	,1267	<b>,0171</b>	,5715	,6343
ABC	,4606	,6684	,3647	,5237	,2288	,0804	,0590

El análisis estadístico se ha realizado individualmente para cada una de las concentraciones de BAY K 8644 empleadas en la curva concentración-respuesta en situación basal.

$p < 0,05$  indica que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular del BAY K 8644.

#### 4.2.2.- Arterias expuestas a una solución de K<sup>+</sup> 15 mM

Cuando los segmentos arteriales estaban previamente expuestos a una solución de K<sup>+</sup> 15 mM, el estudio de la ANOVA de tres factores dio los siguientes resultados (Tabla 13):

*La cepa y el endotelio*, individualmente no modifican las respuestas vasculares a este fármaco en estas condiciones excepto a 10<sup>-11</sup> y 10<sup>-10</sup> M en el caso de la cepa y 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> M en el caso del endotelio. Sin embargo, la *edad* del animal, puede modificar los valores contráctiles del BAY K 8644 a lo largo de toda la curva concentración-respuesta.

Al tener en cuenta dos factores juntos, prácticamente las respuestas vasoconstrictoras del BAY K 8644 son las mismas excepto la cepa y el endotelio que *conjuntamente* pueden modificar las respuestas vasculares de este fármaco. Cuando se tienen en cuenta los tres factores juntos (*cepa, edad y endotelio*), éstos no influyen de forma significativa en las respuestas vasculares del BAY K 8644.

Por tanto, en esta situación experimental, las curvas concentración-respuesta a BAY K 8644 sólo parecen verse afectadas en mayor grado por el *edad* de los animales cuando se tiene en cuenta el conjunto de la población.

**Tabla 13.-** Valores de **p** obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (endotelio, cepa y edad) individualmente e interrelacionados entre sí.

BAY K 8644 (log M)							
	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6
<b>CEPA(A)</b>	,4492	<b>,0384</b>	<b>,0146</b>	,0818	,3267	,1304	,6328
<b>ENDOTELIO(B)</b>	,7378	,7417	,4550	,2679	,2513	<b>,0313</b>	<b>,0005</b>
<b>EDAD (C)</b>	<b>,0001</b>	<b>,0005</b>	<b>,0001</b>	<b>,0002</b>	<b>,0022</b>	<b>,0006</b>	<b>,0017</b>
<b>AB</b>	<b>,0083</b>	,1732	<b>,0221</b>	<b>,0259</b>	<b>,0089</b>	,1633	<b>,0022</b>
<b>AC</b>	<b>,0001</b>	,2723	,2971	,2041	,5986	,1272	<b>,0102</b>
<b>BC</b>	,4669	,2074	,2133	,2777	,2660	,2405	<b>,0152</b>
<b>ABC</b>	<b>,0345</b>	,2340	,2364	,8669	,6052	,0799	,9592

El análisis estadístico se ha realizado individualmente para cada una de las concentraciones de BAY K 8644 utilizadas en la curva concentración-respuesta, cuando los segmentos arteriales habían sido expuestos previamente a  $K^+$  15 mM.

$p < 0,05$  indica que el factor o factores objeto de estudio influyen significativamente en la respuesta vascular del BAY K 8644.

## ***DISCUSSION***

---

El tono del músculo liso vascular, principal responsable del mantenimiento de la presión arterial, está regulado por múltiples factores entre los que mencionaremos: 1º) La inervación de los vasos, cuya densidad varía de un lecho vascular a otro, 2º) Las sustancias circulantes como catecolaminas o las liberadas de las plaquetas como serotonina y tromboxanos, 3º) La presión parcial de oxígeno ( $PO_2$ ) y el mismo fluido sanguíneo al rozar o presionar las paredes de los vasos, y 4º) las células endoteliales que influyen en dicho tono al liberar sustancias como eicosanoides, óxido nítrico o endotelinas en respuesta a determinados estímulos (Norberg, 1967; Vanhoutte 1988, 1991).

La influencia que cada uno de estos factores tiene en el control del tono vascular va a depender de las condiciones fisiológicas y del lecho vascular estudiado y van a ser en última instancia los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  en las células musculares lisas los responsables del mantenimiento del tono vascular ya que un incremento en dichos niveles es necesario para que el proceso contráctil tenga lugar. Asimismo, este incremento de  $[Ca^{2+}]_{int}$  es necesario para la síntesis y liberación de factores endoteliales como el EDRF-NO, y para la secreción de neurotransmisores.

Los distintos agentes que incrementan el tono vascular, aumentan los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular de forma diferente. La estimulación de receptores facilita la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula a través de los CDR e induce la liberación de  $Ca^{2+}$  secuestrado en los depósitos intracelulares. Por otra parte, la despolarización de la membrana abre los CVD permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ ; estos canales pueden ser también activados por la interacción de un agonista con su receptor (Hurwitz, 1986; Khalil, 1987; Nelson y col., 1990; Pelzer y col., 1990; Bertolino, y Llinás, 1992).

La entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula puede ser inhibida o facilitada por los

antagonistas y agonistas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la nifedipina (Cauvin y col., 1983) y el BAY K 8644 (Schramm y col., 1983), que ocasionan vasodilatación y vasoconstricción, respectivamente. Algunos autores (Meisner y col., 1981; Yamamoto y col., 1984; Loutzenhinsler y col., 1984; Fleckenstein, 1985) han descrito que la nifedipina y el BAY K 8644 actúan fundamentalmente a nivel de los CVD lo que habla en favor de la existencia de dos vías diferentes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , una a través de los CVD y otra a través de los CDR. Sin embargo, otros autores (Cheung, 1985; Goto y col., 1985; Dong y Wadsworth, 1986; Chiu y col., 1987) han comprobado que estos fármacos actúan con la misma efectividad en los dos tipos de canales, sugiriendo que ambos son la misma entidad.

La hipertensión es un proceso patológico que cursa con un aumento de la resistencia vascular periférica (Nayler, 1988; Marín, 1993). Alteraciones en los movimientos celulares de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían estar involucradas en la hipersensibilidad e hiperreactividad a sustancias vasoconstrictoras y en la hipertrofia observada en arterias de pacientes hipertensos y de animales de experimentación (Mulvany, 1983; Lever, 1986; Lüscher y col., 1988; Sharma y Bhalla, 1988; Scott-Burden y col., 1989; Bolzon y Cheung, 1989). Por otra parte, se ha comprobado también que con la edad se originan cambios asociados al sistema cardiovascular, especialmente en la estructura y función de las arterias. Así, se ha observado engrosamiento y calcificación en la pared vascular humana con una relación colágeno/elastina incrementada (Wellan y Edwards, 1950; Harris 1975) e incremento de la resistencia periférica lo que ocasiona el aumento de la presión arterial.

Estos cambios vasculares producidos por la edad y la hipertensión pueden verse incrementados como consecuencia de alteraciones endoteliales asociadas a estos procesos. Así, se ha demostrado que las respuestas vasodilatadoras dependientes y no dependientes de endotelio están disminuídas en animales viejos (Chinellato y col., 1991).

Los antagonistas de calcio se han utilizado en el tratamiento de la hipertensión debido a sus propiedades vasodilatadoras. Al contrario que otros vasodilatadores estos fármacos disminuyen la presión arterial más eficazmente en hipertensos que en normotensos (Hulthen y col., 1982; Scriabine y Kazda, 1989). Se ha sugerido que este fenómeno es debido a alteraciones en los canales de calcio producidos por la hipertensión (Aoki y col., 1982; Aoki y Asano, 1986; Rusch y Hermismeyer, 1988; Hermismeyer y Rusch, 1989; Hermismeyer, 1991).

Debido a estas alteraciones vasculares asociadas a la hipertensión, la edad y el endotelio, en este trabajo se ha estudiado la influencia de estos tres factores en las respuestas que en segmentos de aorta de rata producen dos moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , el agonista BAY K 8644 y el antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipina. Para ello, se han utilizado aortas de la cepa SHR y su control WKY de diferentes edades. Se ha elegido este modelo de hipertensión animal por ser uno de los más conocidos, y en el que las alteraciones en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  están estrechamente relacionadas con las observadas en la hipertensión esencial (Young y col, 1990). La medida de la presión arterial de estos animales confirmó que estaba elevada en las SHR a partir de los 3 meses y se mantuvo elevada en los animales de año y medio de edad. Sin embargo, las ratas SHR de 5 semanas tuvieron una presión arterial similar a las WKY por lo que se les consideró como prehipertensas.

### **1.- INFLUENCIA DE LA HIPERTENSION EN LAS RESPUESTAS VASCULARES A LOS MODULADORES DE LA ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$**

La hipertensión es un proceso patológico en el que están involucrados distintos mecanismos que dan como resultado final un aumento de la presión arterial. Entre los diferentes factores implicados en el desarrollo de la hipertensión están las modificaciones en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  que ocupan un lugar destacado. Así se han descrito alteraciones en: 1º) Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , 2º) La captación de



$^{45}\text{Ca}^{2+}$  a nivel celular, 3º) La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas de la membrana celular y retículo sarcoplásmico (Marín, 1993). Como resultado de todas estas alteraciones se produce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que probablemente condiciona una respuesta vascular incrementada (Losse y col., 1984; Bukoski y col., 1987; Bukoski, 1990; Jelicks y Gupta, 1990; Sugiyama y col., 1990; Dufilho y col., 1992; Schüssler y col., 1992).

### **1.1.- Efectos de la nifedipina**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el  $\text{K}^+$  indujo respuestas vasoconstrictoras probablemente debidas a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula por los CVD. Estas respuestas fueron similares en arterias con endotelio procedentes de ratas WKY y SHR. Sin embargo, en ausencia de endotelio, las respuestas vasoconstrictoras a  $\text{K}^+$  fueron, en general, mayores en las arterias SHR que en las WKY. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por algunos investigadores (Bolzon y Cheung, 1989; Arvola y col., 1993), aunque otros no observaron diferencias en las respuestas vasoconstrictoras del  $\text{K}^+$  entre una y otra cepa (Lipe y Moulds, 1985; Dong y Wadsworth, 1986). El incremento en las respuestas a  $\text{K}^+$  en arterias hipertensas puede ser debido a un aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CVD en la cepa SHR.

En las arterias contraídas con  $\text{K}^+$ , la relajación originada por la nifedipina en los segmentos con endotelio procedentes de animales de 3 meses, 6 meses y 1,5 años, fue mayor en aorta de la cepa SHR que WKY. Otros investigadores han mostrado también un aumento de la potencia de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  en vasos de la cepa SHR en comparación a sus controles (Hulthen y col., 1982; Takata y Hutchinson 1983; Kazda y col., 1985; Boonen y De Mey., 1990; Cattaneo y col., 1990; Arvola y col., 1992; Arvola y col., 1993). En otro modelo de hipertensión animal, el de la perinefritis de conejo, también se ha encontrado un mayor efecto de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipina y nimodipina (Dong y Wadsworth, 1986). Sin

embargo, otros resultados indican equipotencia de algunos antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  en vasos de las cepas SHR y WKY o incluso mayor respuesta en la cepa WKY (Nghiem y col. 1982; Aoki y Asano, 1986; Cauvin y col., 1987; Cassie y col., 1990; Cattaneo y col., 1990). Las diferencias observadas entre los distintos investigadores en las respuestas vasculares de la nifedipina pueden ser debidas al tipo de lecho vascular utilizado y al tipo de agente vasoconstrictor empleado en la realización de los experimentos. Además, la presencia o no de endotelio parece también influir en la respuesta de la nifedipina. Así pudimos observar que su efecto fue mayor en aorta de la cepa WKY que en la cepa SHR en segmentos sin endotelio, de 3 meses, 6 meses y 1 año.

Cuando se analizaron estadísticamente los datos mediante el análisis de la varianza, se confirmó que la respuesta vascular de la nifedipina depende del tipo de cepa, tanto en segmentos con endotelio como sin endotelio. Cuando la ANOVA se hizo para cada edad no se obtuvieron diferencias estadísticas en función de la cepa a las 5 semanas, 3 meses, 6 meses debido probablemente a la dirección opuesta de los resultados en función de la presencia o ausencia de endotelio. Sin embargo, al año y año y medio si se encontraron diferencias mediante este tipo de estadística en función de la cepa.

Se ha descrito que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen mayor afinidad por el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Morel y Godfraind, 1988; Wibo y col., 1988; Lew y col., 1991; Morel y Godfraind, 1991; Godfraind y col., 1992; Tripathi y col., 1992, 1993). El mayor efecto de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los canales L que se encuentran con mucha frecuencia en los animales hipertensos y también en pacientes hipertensos puede deberse a alteraciones en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Rusch y Hermsmeyer (1988) encontraron alteraciones de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en células musculares lisas vasculares de la cepa SHR y describieron que en estas células se encontraba incrementada la probabilidad de apertura de los canales de calcio de tipo L. Posteriormente, este mismo grupo de investigación (Hermsmeyer y Rusch, 1989;

Hermesmeyer 1991) ha comprobado que en las células hipertensas hay un incremento de la relación canales L/canales T.

De estos resultados, se puede concluir que cuando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce solamente a través de los CVD, el efecto vasodilatador de la nifedipina en segmentos con endotelio es mayor en la cepa SHR, mientras en segmentos sin endotelio, la respuesta vasodilatadora de la nifedipina es mayor en la cepa WKY, es decir, el efecto antagonista de la nifedipina es inverso en las dos cepas en función del endotelio. Por tanto, las variaciones en las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina no dependen exclusivamente del tipo de cepa al que pertenezcan los segmentos arteriales, sino también van a estar modificadas por la presencia o no de endotelio. La influencia que el endotelio tiene en las respuestas a los moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se discutirá más adelante.

Las respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA fueron similares en las arterias de las diferentes edades de las cepas SHR y WKY. Existe diversidad de resultados en cuanto al papel de la hipertensión en la respuesta a los agonistas vasoconstrictores. Así, se ha descrito aumento (Bolzon y Cheung, 1989; Boonen y De Mey, 1990), disminución (Kazda y col., 1985; Hyland y col., 1987; Docherty, 1988; Takayanagi y col., 1989; Nielsen y col., 1992) o ningún cambio (Asano y col., 1982; Lipe y Moulds, 1985; Aoki y Asano, 1986; Dong y Wadsworth, 1986; Grammas y col., 1991) en dichas respuestas, dependiendo del lecho vascular y modelo de hipertensión utilizado.

La respuesta vasodilatadora de nifedipina en segmentos precontraídos con NA fue de similar magnitud a la observada cuando la contracción fue inducida por  $\text{K}^+$ . Resultados similares han obtenido otros investigadores (Dong y Wadsworth, 1986; Kazda y col., 1985), sugiriendo la posibilidad de que la despolarización con  $\text{K}^+$  y la activación de receptores  $\alpha$  adrenérgicos por NA provoque la apertura del mismo canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la aorta de rata. Actualmente muchos autores dudan de la

existencia de los CDR. Se ha demostrado que la unión de un agonista con su receptor provoca apertura de los CVD (Nelson y col., 1988, 1990) y se ha sugerido que la producción de un segundo mensajero intracelular puede modular la apertura de estos canales. Existen varias posibilidades para esta modulación: 1º) La fosforilación de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  por proteincinasa A o proteincinasa C incrementan el tiempo de apertura del canal y por tanto mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y contracción (Nelson y col., 1990; Berridge, 1992; Rembold, 1992). 2º) La activación de las proteínas G (probablemente a través de las subunidad  $\beta$  y  $\gamma$ ) puede favorecer directamente la apertura de los canales de tipo L (Nelson y col., 1990; Berridge, 1992; Rembold, 1992). 3º) El  $\text{IP}_4$  generado a partir del  $\text{IP}_3$  favorece el estado de conformación abierto del canal; de hecho el CVD puede ser el receptor para el  $\text{IP}_4$  (Brown y Birnbaumer, 1990). 4º) El mismo  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del retículo sarcoplásmico puede incrementar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los CVD de manera que el vaciamiento de los depósitos del retículo sarcoplásmico puede ser la señal que active la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Casteels y col., 1990).

Por otra parte, la acción vasodilatadora de este antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  en arterias contraídas con NA fue también en general mayor en la cepa SHR que en la WKY, pero en este caso tanto en los segmentos con como sin endotelio cuando el análisis estadístico se hizo mediante la t de Student. Sin embargo, al efectuar el análisis de la varianza de dos factores en función de la cepa, el valor de  $p$  no fue significativo en los segmentos con endotelio, probablemente debido a que al ser un estudio en el conjunto de la población, las diferencias puntuales observadas a una determinada edad se contrarrestaron con los valores obtenidos a otras edades.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores que han descrito que diversos antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  muestran más eficacia para inhibir las contracciones inducidas por NA en arterias de SHR que de WKY (Kazda y col., 1985; Atkinson y col., 1988; Wanstall y O'Donnell, 1988; Boonen y De Mey, 1990). Por el contrario, otros han descrito un efecto inhibitor de los antagonistas

de  $\text{Ca}^{2+}$  menor en la cepa SHR que en su cepa control (Lipe y Moulds, 1985; Cauvin y col., 1987; Khalil y col., 1990) o no encontraron diferencias en la respuesta de la aorta torácica al verapamil entre SHRSp ("stroke-prone spontaneously hypertensive rats") y WKY (Kobayashi y col., 1992).

Se ha demostrado que la NA actúa sobre receptores  $\alpha_1$  en aorta de rata normotensa (Timmermans y col., 1987; Oriowo y Ruffolo, 1992), y se ha sugerido la posibilidad de que las diferencias entre la cepa SHR y WKY sean debidas a una disminución en los receptores  $\alpha_1$  de reserva de la cepa SHR (Kojima y col., 1989), aunque no se han observado variaciones en la afinidad de los agonistas a los adrenoreceptores  $\alpha_1$  (Takayanagi y col., 1989). Todo esto podría explicar esta mayor sensibilidad a los bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de arterias contraídas con NA de la cepa SHR, ya que existe una relación inversa entre los receptores  $\alpha_1$  de reserva y la sensibilidad al bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en músculo liso vascular (Holck, 1988; Kojima y col., 1989).

De estos resultados se puede concluir que la hipertensión puede modificar las respuestas vasculares a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto cuando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular se produce por despolarización y apertura de los CVD (en este caso también es dependiente de la presencia o no de endotelio) o cuando está mediada por el acoplamiento de una agonista  $\alpha$  adrenérgico (NA) a su receptor.

### **1.2.- Efectos del BAY K 8644**

El BAY K 8644 produce efectos vasoconstrictores al aumentar la frecuencia y probabilidad de apertura de los canales de calcio voltaje dependiente tipo L (Hess y col., 1984; Kokubun y Reuter, 1984; Trigle y Janis, 1989).

Este fármaco se administró a los segmentos en situación basal o después de una despolarización parcial con  $\text{K}^+$  15 mM. Se observó que en ratas de la cepa

WKY de 6 meses, 1 año y 1,5 años, tanto en los segmentos con endotelio como sin endotelio, la respuesta del BAY K 8644 era mayor en segmentos arteriales previamente despolarizados. Estas diferencias no se apreciaron en la cepa SHR salvo en segmentos sin endotelio de 1,5 años.

Cuando la membrana se despolariza parcialmente con una solución de  $K^+$  15 mM se produce la apertura de los CVD a través de los cuales entra  $Ca^{2+}$  al interior celular (Bolton, 1979; Cauvin y col., 1983; Marín, 1988). El hecho de que en la cepa SHR las respuestas vasoconstrictoras del BAY K 8644 en situación basal y con despolarización parcial fueran similares, hace suponer que los CVD en la cepa SHR probablemente estén tónicamente activados. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Aoki y Asano (1986) en arterias femorales de la cepa SHR o por Bruner y Webb (1990) en arteria carótida de la cepa SHRSp. La necesidad de una previa despolarización para que el BAY K 8644 produzca una entrada adicional de  $Ca^{2+}$  y ejerza sus efectos vasoconstrictores ha sido descrita en muchos vasos, incluidos la aorta de rata (Schramm y col., 1983; Hess y col., 1984, Kokubun y Reuter, 1984; Loutzenhinser y col., 1984; Salaices y col., 1985; Rico y col., 1990). Sin embargo, en otros vasos, fundamentalmente cerebrales (Salaices y col., 1985; Golapakrishnan y col., 1985; Asano y col., 1987; Fernández-Alfonso y col., 1988) este agonista de  $Ca^{2+}$  ejerce acciones vasoconstrictoras en condiciones basales.

Al estudiar la influencia de la cepa, sobre las respuestas al BAY 8644 en situación basal, a las edades de 5 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año, se observó que el efecto contráctil producido por el BAY K 8644 era mayor en las SHR que en las WKY, tanto en segmentos con o sin endotelio. A 1,5 años, sucedió lo mismo en los segmentos con endotelio, pero cuando carecían del mismo, la respuesta del BAY K 8644 era mayor en la cepa WKY. Al efectuar el análisis de la varianza (ANOVA), se confirmó que el tipo de cepa influía en las respuestas contráctiles del BAY K 8644 tanto en segmentos con endotelio (que dependía además de la concentración de fármaco utilizada) como sin endotelio. A la edad de 1,5 años, el

análisis de la varianza en función de la cepa no dio significativo a pesar de que si lo fue mediante la t de Student debido probablemente a la aparición de un efecto inverso en las dos cepas en función del endotelio.

Cuando los segmentos arteriales se despolarizaron parcialmente con una solución de  $K^+$  15 mM, se comprobó que la respuesta a los 3 meses, 6 meses, 1 año y 1,5 años era también mayor en la cepa SHR en los segmentos sin endotelio. El análisis de la varianza confirmó estos resultados. Este mayor efecto del BAY K 8644 en segmentos de la cepa SHR parcialmente despolarizados, puede ser debido a una mayor sensibilidad de los segmentos aórticos de la cepa SHR a despolarizaciones parciales con bajas concentraciones de  $K^+$  en comparación a la cepa WKY (Guan y Kwan, 1989). Por otro lado, las diferencias observadas en función del endotelio pueden ser debidas a que la liberación espontánea de EDRF tiene un efecto más significativo en despolarizaciones parciales (Spedding y col., 1986).

En otros lechos vasculares se ha descrito también una mayor reactividad del BAY K 8644 en segmentos arteriales de animales hipertensos que en los normotensos (Aoki y Asano, 1986; Bolzon y Cheung, 1989; Storm y col., 1990). En la cepa SHR se ha descrito una mayor densidad de receptores dihidropiridínicos en los CVD (Navaratnam y Khatter, 1990, 1991) en relación a su cepa control. Igualmente, se ha comprobado que las corrientes de  $Ca^{2+}$  a través del canal L están aumentadas en células de vena azigós de la cepa SHR (Hermsmeyer y Rusch., 1989; Erne y Hermsmeyer, 1989; Hermsmeyer, 1991). De esta manera, el BAY K 8644 al tener gran afinidad por este tipo de canal daría lugar a un efecto mayor en esta cepa. Se ha descrito en eritrocitos de la cepa SHR, la existencia de un péptido, el cual está también presente en la cepa WKY, pero a concentraciones significativamente más bajas que en la cepa SHR, el cual podría actuar como modulador endógeno de los canales de  $Ca^{2+}$  y dar lugar a un aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático (Huang y col., 1987; Sugiyama y col., 1990). Por el contrario, en arteriolas de la cepa SHR y WKY no se han observado diferencias en las respuestas

vasomotoras del BAY K 8644 (Storm y col., 1992). En aortas de conejos hipertensos se ha descrito un efecto menor del BAY K 8644 en relación a sus controles (Dong y Wadsworth, 1986). Estas diferencias son probablemente debidas a una variabilidad en el número y tipo de CVD en función del lecho vascular.

Con estos resultados y los discutidos anteriormente en relación con el efecto de la nifedipina, se puede concluir que la hipertensión influye en los efectos de los moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los CVD .

## **2.- INFLUENCIA DE LA EDAD EN LAS RESPUESTAS VASCULARES A LOS MODULADORES DE LA ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$**

La edad puede estar asociada a cambios en el sistema cardiovascular especialmente en la estructura y función de las arterias (Wei y col., 1989; Safar, 1990). Igualmente el riesgo de complicaciones cardiovasculares es de 2 a 5 veces mayor en hipertensos mayores que en normotensos de igual edad (Smith, 1988) y dos veces más que en jóvenes con la misma presión arterial (Vokonas y col., 1988). Todo esto hace suponer que la edad puede implicar cambios en las respuestas vasomotoras a los moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **2.1.- Efectos de la nifedipina**

Las respuestas vasoconstrictoras de los segmentos arteriales de las cepas WKY y SHR despolarizados con  $\text{K}^+$  fueron similares a los 3 meses, 6 meses, 1 año y año y medio, aunque en general fueron mayores que las obtenidas a las 5 semanas. Por el contrario, Wanstall y O'Donnell (1989) han descrito que la vasoconstricción inducida por el  $\text{K}^+$  fue menor en aortas ratas viejas que en jóvenes. Sin embargo, Cox y Kikta (1992) no observaron diferencias dependientes de la edad en la respuesta vasoconstrictora originada por el  $\text{K}^+$  en aorta de ratas hipertensas.



Las respuestas vasodilatadoras a nifedipina fueron variables dependiendo de la edad del animal. Así, en segmentos arteriales de la cepa WKY despolarizados con  $K^+$  50 mM, el efecto vasodilatador mayor de la nifedipina se observó a la edad de 1 año, y en la cepa SHR, a la edad de 1,5 años. Por el contrario, Wanstall y O'Donnell (1989), no obtuvieron con el diltiazem diferencias en segmentos de aorta de ratas jóvenes y viejas.

Cassie y col. (1990) apuntan la posibilidad de que la edad produce anomalías en la sensibilidad al  $Ca^{2+}$ , siendo una característica adquirida no involucrada en la etiología de la hipertensión. Por otro lado, la edad, causa un aumento de los lugares de fijación de las dihidropiridinas y un aumento de su constante de afinidad, siendo independiente de la presencia o no de hipertensión (Dillon y col., 1989), lo que explicaría el mayor efecto encontrado en los animales viejos. Por el contrario, Yoshida y col. (1992) no observaron diferencias con la edad en la afinidad de los antagonistas dihidropiridínicos a su receptor en uréter de conejo.

La NA, como se dijo anteriormente, actúa fundamentalmente en los receptores  $\alpha_1$  del músculo liso vascular de la aorta de rata que se encuentran acoplados a dos procesos de transducción; uno produce la movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular y otro abre los canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática para permitir la entrada de  $Ca^{2+}$  del espacio extracelular, dando origen a una respuesta tónica que es inhibida por los antagonistas dihidropiridínicos (Nishimura y col., 1991; Oriowo y Ruffolo, 1992). Las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la NA en arterias de ratas de 5 semanas fueron en general menores que las obtenidas en el resto de las edades. Muchos investigadores han estudiado la influencia de la edad en la respuesta vascular a NA siendo los resultados obtenidos contradictorios. Así, no se han encontrado diferencias en relación con la edad en vasos de resistencia de rata y conejo (Owen, 1985; Duckles, 1987; Hynes y Duckles, 1987), en vena porta de gato

y cobayo (Lyung y Stage, 1975) y en arteria basilar de conejo (Toda y Hayashi, 1989). Se ha encontrado incremento de dichas respuestas con la edad en la aorta torácica de conejo (Hayashi y Toda, 1978) y en la arteria de la oreja de cordero (Wyse y col., 1977). Por el contrario, disminución en la respuesta a NA con la edad se ha descrito en aorta torácica de conejo (Chinellato y col., 1991), arteria caudal de rata (Fouda y Atkinson, 1986), aorta de rata (Cox y Kikta, 1992), arteria mesentérica de perro (Shimizu y Toda, 1986), arterias cerebrales de mono (Toda, 1991) y perro (Toda y col., 1986) y miocitos cardíacos (Sakai y col., 1992).

Cuando se estudió la influencia de la edad en el efecto vasodilatador de la nifedipina en arterias contraídas con NA, éste fue diferente en función de la cepa y el endotelio. Así, en la cepa SHR el efecto mayor de la nifedipina se registró a los 6 meses y 1,5 años de edad en segmentos arteriales con y sin endotelio, y en la cepa WKY en los segmentos con endotelio de 6 meses y sin endotelio de 1 año de edad.

El efecto dilatador del diltiazem fue más efectivo en arteria pulmonar y aorta de ratas viejas sobre contracciones originadas con NA que en ratas jóvenes (Wanstall y O'Donnell, 1988). Este efecto mayor de los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  en animales viejos puede ser debido a una disminución en la reserva de los adrenoceptores a partir de los 6 meses de edad, aunque no se observa una disminución de la afinidad de estos receptores por la NA (Hyland y col., 1987).

El análisis de la varianza de dos factores mostró que la edad es un factor determinante en las respuestas vasodilatadoras a nifedipina en la cepa SHR y WKY, tanto en ausencia como en presencia de endotelio y contraídas con NA o con  $\text{K}^+$ . De estos resultados se puede concluir que la edad del animal es un factor a tener en cuenta en las respuestas vasculares de la nifedipina.

## **2.2.- Efectos del BAY K 8644**

La administración de BAY K 8644 en situación basal, dió lugar a respuestas contráctiles que fueron dependientes de la edad del animal. De forma general se observó que en los segmentos de ratas más viejas (1,5 años) y de ambas cepas, el efecto vasoconstrictor del BAY K 8644 era menor. En las SHR las respuestas fueron aumentando con la edad hasta los seis meses de edad para luego disminuir a edades mayores. En las WKY, con endotelio, el efecto vasoconstrictor del BAY K 8644 fue mayor a las 5 semanas y en arterias sin endotelio prácticamente no hubo diferencias significativas en las respuestas obtenidas a las diferentes edades. El análisis de la varianza de dos factores (edad y concentración), mostró diferencias significativas en función de la edad en las dos cepas y en segmentos con y sin endotelio. Las diferencias en las respuestas vasomotoras respecto de la edad, en la cepa SHR con y sin endotelio y en la cepa WKY con endotelio, son más importantes a concentraciones bajas de fármaco.

Cuando los segmentos arteriales de las cepas SHR y WKY se despolarizaron previamente con  $K^+$  15 mM se observaron menores respuestas vasculares del BAY K 8644 a las 5 semanas y al 1,5 año de edad que al resto de las edades.

Los resultados existentes en la literatura sobre las respuestas vasculares al BAY K 8644 son controvertidos, ya que algunos autores apuntan a que pueden estar disminuías en ratas viejas y que necesitan además una despolarización parcial de la membrana plasmática para que el agonista pueda realizar su efecto (Wanstall y O'Donnell, 1989), otros que la edad no altera (Sakai y col., 1992) o reduce (Ruch y col., 1992) los efectos vasoconstrictores del BAY K 8644 y en las células miocárdicas se ha observado una sensibilidad mayor al BAY K 8644 durante el envejecimiento (Khatter y Navaratman, 1992).

Todas estas variaciones en función de la edad apuntarían a posibles cambios en los CVD, así como en las propiedades de unión de este compuesto al canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, Golik y col. (1992) al efectuar un estudio de los CVD en el cerebro de ratón  $\text{CW}_1$  no observaron diferencias con la edad en el número de sitios de fijación de las dihidropiridinas ni en su constante de afinidad.

### **3.- PAPEL DEL ENDOTELIO EN LAS RESPUESTAS VASCULARES A LOS MODULADORES DE LA ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$**

Esta bien establecido que las células endoteliales son capaces de sintetizar importantes mediadores de las respuestas vasodilatadoras o vasoconstrictoras (Angus y Cocks, 1989; Vane y col., 1990). Se han observado disminuciones en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio en distintos modelos de hipertensión (Winqvist y col, 1984; Lüscher y Vanhoutte, 1986a; Tesfamarian y Halpern, 1988; Pourageaud y Freslon, 1992). La liberación de factores endoteliales requiere como paso previo el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en las células endoteliales (Angus y Cocks, 1989). Los efectos de los moduladores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la liberación de EDRF de las células endoteliales no está claro. Así, Rubanyi y col. (1985) han descrito que el BAY K 8644 potencia la liberación de EDRF y Singer y Peach (1982) que los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  la inhiben. Sin embargo, otros investigadores (Spedding y col., 1986; Vanhoutte, 1988; Kikawa y col., 1989) han observado que los moduladores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no modifican la liberación de EDRF de las células endoteliales. En vista de estos resultados conflictivos, hemos estudiado si el endotelio vascular influye en las respuestas de los moduladores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de la aorta de rata de las cepas SHR y WKY.

### **3.1.- Efectos de la nifedipina**

Las respuestas vasoconstrictoras inducidas por  $K^+$  fueron en general similares en arterias con endotelio que sin endotelio en ambas cepas de ratas. Estos resultados coinciden con los descritos por Spedding y col. (1986) y Mikkelsen y col. (1988) en aorta de rata.

Los resultados obtenidos con nifedipina muestran que sus respuestas vasodilatadoras tanto en aorta de la cepa SHR como WKY, van a depender de la presencia o no de endotelio. En la SHR, el efecto relajante de este fármaco fue mayor en los segmentos arteriales con endotelio y su acción dependió de la concentración de nifedipina utilizada. En la cepa WKY, el efecto de la nifedipina era mayor en los segmentos arteriales sin endotelio, no influyendo la concentración de nifedipina utilizada. Por tanto, la presencia de endotelio modula de forma inversa las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina.

Al efectuar el análisis de la varianza de dos factores se confirmó que el endotelio de la aorta de las cepas SHR y WKY modula la relajación inducida por nifedipina cuando la entrada de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular se produce a través de los CVD activados por  $K^+$ .

Para analizar si la respuesta a nifedipina era modulada por la liberación endotelial de NO se administró un inhibidor de su síntesis el L-NAME. Este fármaco es un derivado de la L-arginina que inhibe las relajaciones dependientes de NO inducidas por la acetilcolina en segmentos aórticos de ratas (Rees y col., 1990; Schultz y col., 1990). La administración intravenosa de L-NAME a ratas normotensas causan un aumento sostenido de la presión sanguínea y vasoconstricción regional (Gardiner y col., 1990).

Los experimentos realizados en el presente trabajo con el inhibidor de la síntesis de NO muestran que no modificó o incluso incrementó la respuesta vasodilatadora de la nifedipina lo que indica que el efecto endotelial observado no está mediado por dicho factor endotelial. Este dato se confirmó también por el hecho de que la administración de L-arginina  $10^{-4}$  M, precursor de la síntesis de NO (Palmer y col., 1988) sólo o con L- NAME  $10^{-5}$  M no modificó las respuestas de la nifedipina.

Nuestros resultados están en consonancia con el hecho de que no se ha observado diferencias en la capacidad de los vasos de las cepas SHR y WKY para liberar EDRF (Lüscher y col., 1987; Hoeffner y Vanhoutte, 1989). Igualmente la síntesis de NO parece ser similar en las cepas SHR y WKY (Fozard y Part, 1991; Yamazaki y col., 1991). Otros autores apuntan la posibilidad de que en la hipertensión prevalecería una liberación de factores contráctiles (EDCFs) con una liberación normal de EDRF o incluso una reducción observada en la cepa SHR (Schleiffer y col., 1991; Pourageaud y Freslon, 1992).

La administración de NA indujo respuestas contráctiles prácticamente iguales en arterias de ambas cepas con o sin endotelio. Al igual que esta descrito en diversos lechos vasculares (Mikkelsen y col., 1988; Lai y col., 1989). Sin embargo, en otros vasos se ha descrito un incremento en las respuestas contráctiles a NA en arterias sin endotelio (Malta y col., 1986; Auguet y col., 1989; Osugi y col., 1990; Auch-Schwelk y Vanhoutte 1991; Gil-Longo, 1992) debido probablemente a la liberación basal de EDRF.

Cuando las arterias se habían contraído con NA, la presencia o no de endotelio modificó también las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina tanto en la cepa SHR como en la WKY, pero en la primera esta modificación dependió de la concentración de nifedipina utilizada. En efecto, en la cepa SHR, la presencia de endotelio potenció el efecto vasodilatador de la nifedipina a los 3 y 6 meses. Un

efecto similar se encontró en la cepa WKY en segmentos de 5 semanas y 6 meses, mientras al año y año y medio se observó una disminución del efecto vasodilatador de la nifedipina. El estudio estadístico mediante la t de Student y el análisis de la varianza de dos factores dio como resultado que la presencia de endotelio influye en el efecto de la nifedipina a edades tempranas (5 semanas, 3 meses y 6 meses), mientras en las ratas más viejas (1 y 1,5 años) el endotelio no modificó las respuestas de la nifedipina salvo a concentraciones altas de fármaco, en donde el efecto de la nifedipina era mayor en los segmentos sin endotelio, sobre todo en la cepa WKY. Estos resultados pueden ser debidos a que a medida que aumenta la edad del animal pueden desarrollarse alteraciones a nivel endotelial.

Las relajaciones provocadas por nifedipina en arterias con endotelio de 6 meses contraídas con NA no se modifican con L-NAME lo que indica que el mayor efecto vasodilatador de la nifedipina en arterias con endotelio no se debe a la liberación de NO. Sin embargo, este fármaco incrementó las respuestas a NA probablemente debido al bloqueo de la liberación basal de NO.

Los resultados obtenidos por diferentes autores sobre la influencia del endotelio en las respuestas a los antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  son muy variados y dependen del tipo de vaso, del agente vasoconstrictor y del antagonista utilizado. Así Rubanyi y col. (1988b) no encontraron diferencias de las respuestas vasodilatadoras en función del endotelio de distintos antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  en arteria femoral de perro contraída con prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ . Sin embargo, Miller y Stoclet (1985) encontraron que el efecto vasodilatador de la flunaricina en aorta de rata era mayor en presencia que en ausencia de endotelio, siendo la respuesta igual cuando el agente contráctil era NA. Vanhoutte (1986), observó en arteria coronaria de perro contraída con agonistas  $\alpha$  adrenérgicos que la nisoldipina presentaba mayor efecto en presencia que en ausencia de endotelio.

### **3.2.- Efecto del BAY K 8644**

En situación basal, el efecto contráctil del BAY K 8644 no dependió de la existencia o no de endotelio en la cepa WKY. Sin embargo, en la cepa SHR y en segmentos de 3 meses y 1,5 años la presencia de endotelio aumentó la respuesta vasoconstictora del BAY K 8644, siendo este aumento dependiente de la concentración de fármaco. Este dato se confirmó mediante el análisis de la varianza, que mostró que sólo en la cepa SHR, el endotelio es capaz de modular la respuesta contráctil del BAY K 8644. Esta respuesta moduladora del endotelio puede sugerir que el BAY K 8644 puede ocasionar en la cepa SHR la liberación de un factor o factores endoteliales contráctiles. En aorta de SHR, se ha descrito la existencia de un factor contráctil endotelial, identificado como un metabolito del ácido araquidónico capaz de originar vasoconstricción (Lüscher y Vanhoutte 1986; Lawson y Caverio, 1989). Estos mismos resultados han sido encontrados también por Lüscher y col. (1988) en arterias renales de la cepa SHR. Es posible que el BAY K 8644 promueva dicha liberación al facilitar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células endoteliales. Por el contrario, otros investigadores han descrito que la presencia de endotelio disminuye las respuestas vasoconstrictoras del BAY K 8644 en aorta de rata (Spedding y col., 1986; Mikkelsen y col., 1988).

A diferencia de los resultados obtenidos en situación basal, cuando los segmentos arteriales se despolarizaron parcialmente con una solución de  $\text{K}^+$  15 mM no se observaron diferencias en las SHR en función del endotelio. Sin embargo, en las WKY de 3 meses, 1 año y 1,5 años de edad, la respuesta a este agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  fue mayor en presencia de endotelio. Este hecho se ratificó mediante el análisis de la varianza de dos factores. Estos resultados están en consonancia con los descritos por Lawson y Caverio (1989), originando el BAY K 8644 en ratas normotensas efectos contráctiles en aorta de rata debido a la liberación de un factor o factores contráctiles derivados de endotelio. Por el contrario, Williams y col., 1987; han



descrito que el BAY K 8644 origina efectos vasoconstrictores mayores en segmentos desendotelizados y ha sugerido que el BAY K 8644 puede producir la liberación de factores vasodilatadores y su efecto neto dependerá del balance entre el efecto vasodilatador producido por esos factores y el vasoconstrictor propio debido a su acción en células musculares lisas.

Por último, cuando se analizaron todos los resultados anteriores en el conjunto de la población mediante el análisis estadístico de la varianza de tres factores (ANOVA), se **obtuvo que:** 1) La hipertensión y la edad del animal, son dos factores que considerados independientemente o conjuntamente, modifican las respuestas vasodilatadoras de la nifedipina en segmentos aórticos precontraídos con  $K^+$ . 2) El efecto vasodilatador de la nifedipina en segmentos precontraídos con NA  $10^{-7}$  M, va a depender de la presencia de endotelio y de la edad del animal. 3) La hipertensión influye en las respuestas vasoconstrictoras del BAY K 8644 en situación basal. 4) La edad del animal modifica los efectos vasoconstrictores del BAY K 8644 en segmentos arteriales despolarizados parcialmente con  $K^+$  15 mM.

## ***CONCLUSIONES***

---

Las conclusiones del presente estudio son las siguientes:

1.- La hipertensión modifica positivamente las respuestas vasodilatadoras a nifedipina, tanto cuando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular se produce por despolarización con  $\text{K}^+$  (en este caso influida por el endotelio), como cuando está mediada por el acoplamiento de la NA a su receptor.

2.- La edad es un factor a tener en cuenta en las respuestas relajadoras de nifedipina. El efecto mayor de este antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cepa SHR se encontró a los 6 meses y 1,5 años de edad en segmentos con y sin endotelio, mientras que en la cepa WKY se observó a los 6 meses en segmentos con endotelio y al año en segmentos sin endotelio.

3.- La presencia de endotelio modula positivamente las respuestas vasodilatadoras en la cepa SHR mientras que en la cepa WKY las modula negativamente en segmentos precontraídos con  $\text{K}^+$  50 mM. Esta modulación es independiente de la liberación endotelial de NO.

4.- Las respuestas vasoconstrictoras inducidas por BAY K 8644 fueron mayores en los segmentos aórticos de la cepa SHR que en los procedentes de la cepa WKY sobre todo en situación basal. Este incremento de respuesta a este agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias hipertensas puede ser debido a una preactivación de los CVD o alteración del potencial de membrana.

5.- En la cepa SHR y WKY cuando el músculo liso vascular ha sido despolarizado parcialmente con 15 mM de  $\text{K}^+$ , el BAY K 8644 origina respuestas contráctiles menores en ratas jóvenes (5 semanas) y ratas viejas (1,5 años) que en el resto de las edades. En situación basal, sólo se observó esta disminución en segmentos sin endotelio de la cepa SHR de 1,5 años.

6.- La presencia de endotelio influye positivamente en las respuestas inducidas por BAY K 8644 en arterias de la cepa SHR en situación basal y en arterias de la cepa WKY despolarizadas parcialmente con  $K^+$  15mM. Esto puede ser debido a la liberación de un factor o factores contráctiles por el endotelio vascular.

## ***BIBLIOGRAFIA***

---

**AALKJAER C. (1990).** Regulation of intracellular pH and its role in vascular smooth muscle function. *Hypertension* 8: 197-207.

**AALKJAER C. y GRAGOE E. J. (1988).** Intracellular pH regulation in resting and contracting segments of rat mesenteric resistance vessels. *J. Physiol.* 402: 391-410.

**AALKJAER C. y MULVANY M. J. (1988).** Angiotensin II and noradrenaline induced contraction and intracellular pH in segments of rat resistance vessels. En: *Resistance Arteries* Eds: Halpern W.; Pelgram B.; Brailen J. y col. Perinatology Press Ithaca., New York pp: 229-234.

**ABBOT A. (1988).** Interrelationship between Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> metabolism in hypertension. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 11-13.

**ABDEL-LATIF A. A. (1986).** Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generator of second messengers. *Pharmacol. Rev.* 38: 227-272.

**ABKARALI H. I.; WYSE D. G. y GILES W. R. (1992).** Ionic currents in single cells from human cystic artery. *Circ. Res.* 70: 536-45.

**ALDELSTEIN R. S. y HATHAWAY D. R. (1979).** Role of calcium and cyclic adenosine 3,5 monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanism of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am. J. Cardiol.* 44: 783-787.

**ADMIRAAL P. J. J.; DERKX F. H. M.; DANSER A. H. J.; PIETERMAN H. y SCHALEKAMP M. A. D. H. (1990).** Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension. *Hypertension* 15: 44-55.

**AKBAR H.; CHEN N. Y.; FOSSEN D. V. y WALLACE D. (1989).** Increased vascular contractile sensitivity to serotonin in spontaneously hypertensive rats is linked with increased turnover of phosphoinositides. *Life Sci.* 45: 577-583.

**ALLEN G. S. (1985).** Role of calcium antagonists in cerebral arterial spasm. *Am. J. Cardiol.* 55: 149B-153B.

**ALTIERE R. J.; KIRITSY-ROY J. A. y CATRAVAS J. D. (1986).** Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A<sub>2</sub>. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 535-541.

**ANGUS J. A.; BROUGHTON A. y MULVANY M. J. (1988).** Role of alpha-

adrenoceptors in constrictor responses of rat, guinea-pig and rabbit small arteries to neural activation. *J. Physiol.* 403: 495-510.

**ANGUS J. A. y COCKS T. M. (1989).** Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* 41: 303-351.

**ANTONACCIO M. J. (1982).** Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann. Rev. Pharmacol. Tox.* 22: 57-87.

**ANTONACCIO M. J. y WRIGHT J. J. (1990).** Renin-angiotensin system, converting enzyme, and renin inhibitors. En: *Cardiovascular Pharmacology*. Eds: Antonaccio M J. Raven Press, New York pp: 201-228.

**AOKI K. y ASANO M. (1986).** Effects of dihydropyridine calcium agonist and antagonist on femoral arteries isolated from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 4: S138-S140.

**AOKI K.; KAWAGUCHI Y.; SATO K.; KONDO S. y YAMAMOTO M. (1982).** Clinical and pharmacological properties of calcium antagonists in essential hypertension in humans and spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4: S298-S302.

**AQEL M. G.; SHARMA R. V. y BHALLA R. C. (1987).** Increased <sup>45</sup>Ca influx in response to  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in spontaneously hypertensive rat caudal artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10: 205-212.

**ARMELIN H. A.; ARMELIN M. C. S.; KELLY K.; STEWART T.; LEDER P.; COCHRAN B. H. y STILES C. D. (1984).** Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310: 655-660.

**ARVOLA P.; PÖRSTI I.; VUORINEN P.; PEKKI A. y VAPAATALO H. (1992).** Contractions induce by potassium-free solution and potassium relaxation in vascular smooth muscle of hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 106: 157-65.

**ARVOLA P.; RUSKOAHO H. y PÖRSTI I. (1993).** Effects of high calcium diet on arterial smooth muscle function and electrolyte balance in mineralocorticoid-dalt hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 108: 948-858.

**ASANO M.; AOKI K. y MATSUDA T. (1982).** Reduced beta adrenoceptor interactions of norepinephrine enhance contraction in the femoral artery from spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 207-14.

**ASANO M.; AOKI K.; SUZUKI T. y MATSUDA T. (1987).** Effects of Bay

K 8644 and nifedipine on isolated dog cerebral, coronary and mesenteric arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 646.

**ASANO M.; MASUZAWA K.; KOJIMA M.; AOKI K. y MATSUDA T. (1988).** Comparison of inhibitory effects of calcium channel blockers and that of a calmodulin antagonist in strips of mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 48: 77-90.

**ASHER C.; CRAGOE E. J. Jr. y GARTY H. (1987).** Effects of amiloride analogues on Na<sup>+</sup> transport in toad bladder membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 262: 8566-8573.

**ATKINSON J.; SAUTEL M.; SONNAY M.; FLUCKGER J. P.; DE RIVAZ J. C.; BOILLAT N.; PITON M. C.; PORCHET P. A.; AMRSTRONG J. M. y FOUDA A. K. (1988).** Greater vasodepressor sensitivity to nicardipine in spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to normotensive rats. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 337: 471-476.

**AUCH-SCHWELK W. y VANHOUTTE P. M. (1991).** Calcium antagonists inhibit contractions to norepinephrine in the rat aorta, in the absence, but not in the presence of the endothelium. *Gen. Pharmacol.* 22: 595-602.

**AUGUET M.; DELAFLOTTE S.; PIROTZKY E.; CLOSTRE F. y BRAQUE P. (1989).** Role of endothelium on phenylephrine-triggered contractile events in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 3: 655-664.

**AUNIS D. y GARCIA A. G. (1981).** Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [<sup>3</sup>H]-ouabain binding to plasma membranes. *Br. J. Pharmacol.* 72: 31-40.

**AVIV A. y LASHER N. (1990).** Proposed defects in membrane transport and intracellular ions as pathogenic factors in essential hypertension. En: *Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Eds: Laragh J H. y Brenner B M. Raven Press, New York pp: 923-937

**BABA A.; FUKUDA K.; HANO T.; SHIOTANI M.; YOSHIBAWZ H.; URAM.; NAKAMURA Y.; KUCHII M.; NISHIO I. y MASUYAMA Y. (1990).** Responses of cytosolic free calcium to ADP in platelets of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertension* 3: 224S-226S.

**BACHMANN S.; PETERS J.; ENGLER E.; GANTEN D. y MOLLINS J. J. (1992).** Transgenic rats carrying the mouse renin gene-morphological characterization of a low renin hypertension. *Kidney Int.* 41: 24-26.



**BARRY W. H.; HASIN Y. y SMITH T. W. (1985).** Sodium pump inhibition, enhanced calcium influx via sodium-calcium exchange, and positive inotropic response in cultured heart cells. *Circ. Res.* 56: 231-241.

**BAUKAL A. J.; GAETAN G.; RUBIN R.; SPAT A. y CATT K. J. (1985).** Binding sites for inositol triphosphate in the bovine adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 : 532-538.

**BEAN B. P.; STUREK M.; PUGGA y HERMSMEYER K. (1986).** Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Cir. Res.* 59: 229-235.

**BECKER R. H. A.; LINZ W. y SCHÖLKENS B. A. (1989).** Pharmacological interference with the cardiac renin-angiotensin system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14: S10-S15.

**BENHAM C. D.; HESS P. y TSIEN R. W. (1987).** Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Cir. Res.* 61: 10-16.

**BERMAN D. M. y GOLDMAN W. F. (1992).** Stored calcium modulates inositol phosphate synthesis in cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 263: C535-C539.

**BERRIDGE M. J. (1992).** Phosphoinositides and cell signaling. Fidia Research Foundation Neurosciences Award Lectures. Raven Press. pp: 5-45.

**BERRIDGE M. J. y IRVINE R. F. (1989).** Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-204.

**BERTHELOT A. y GAIRARD A. (1980).** Parathyroid hormone and deoxycorticosterone acetate-induced hypertension in the rat. *Clin. Sci.* 58: 365-371.

**BERTOLINO M. y LLINÁS R. R. (1992).** The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Tox.* 32: 399-421.

**BERTORELLO A. y APERIA A. (1989).** Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is an effector protein for proteinkinase C in renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 256: F370-F373.

**BEVAN J. A; BEVAN R. D.; HWA J. J.; OWEN M. P. y TAYO F. M. (1986).** Calcium regulation in vascular smooth muscle: Is there a pattern to its variability within the arterial tree?. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: S71-S75.

**BERPROZVANNY I.; WATRAS J. y ERLICH B. E. (1991).** Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5) P<sub>3</sub> and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351: 751-754.

**BIANCHI G.; BAER P. G.; FOX U.; DUZZI L.; PAGETT D. y BIOVANNETTI A. M. (1975).** Changes in renin, water balance, and sodium balance during development of high blood pressure in genetically hypertensive rats. *Circ. Res.* 37: 1153- 1161.

**BINDELS R. J. M.; VAN DEN BROCK L. A. M.; JONGEN M. J. M.; HACKENG W. H. L.; LOWIK C. W. G. y VAN OS C. H. (1987).** Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis. *Pflügers Arch.* 408: 395-400.

**BIRKENHAGER W. H.; DE LEUW P.; SAIDA K. y VAN BREEMEN C. (1988).** Treatment of hypertension in the elderly. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2: 275-279.

**BLAKEBOROUGH P.; NEVILLE S. G. y ROLLS B. A. (1990).** The effect of diets adequate in calcium on blood pressures and the activities of intestinal and kidney plasma membrane enzymes in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 63: 65-78.

**BLAUSTEIN M. P. (1985).** The cellular basis of cardiotonic steroid action. *Trends Pharmacol. Sci.* 7: 289-292.

**BLAUSTEIN M. P. (1988).** Sodium/calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12: 56-68.

**BLAUSTEIN M. P.; ASHIDA T.; GOLDMAN W. F.; WIER W. G. y HAMLYN J. M. (1987).** Sodium/Ca<sup>2+</sup> exchange in vascular smooth muscle a link between sodium metabolism and hypertension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 494: 1-299.

**BOHR D. F. y WEBB R. C. (1988).** Vascular smooth muscle membrane in hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* 28: 389-409.

**BOLGER G. T.; GENGO P. J.; KLOCKOWSKI R.; LUCHOWSKI E. M.; SIEGEL H.; JANIS R. A. y TRIGGLE D. J. (1983).** Characterization of binding of the Ca<sup>+</sup> channel antagonist, [<sup>3</sup>H] nitrendipine to guinea-pig ileum smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225: 291-309.

**BOLGER G. T.; LIARD F.; JODOIN A. y JARAMILLO J. (1991).** Vascular reactivity, tissue levels and binding sites for endothelin: a comparison in the

spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69: 406-413.

**BOLTON T. B. (1979).** Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718.

**BOLZON B. J. y CHEUNG D. W. (1989).** Isolation and characterization of single vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 14: 137.

**BOONEN H. C. y DE MEY J. G. R. (1990).** G-proteins are involved in contractile responses of isolated mesenteric resistance arteries to agonists. *Naunyn-Schmiedebers Arch. Pharmacol.* 342: 462-468.

**BORKOWSKI K. R. y QUINN P. (1985).** Adrenaline and the development of spontaneous hypertension in rats. *J. Auton. Pharmacol.* 5: 89-100.

**BOTTRARI S. P.; GASPARRO D. M.; STECKELINGS U. M. y LEVENS R. R. (1993).** Angiotension II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Frontiers in neuroendocrinology* 2: 123-171.

**BRAND D. M. (1988).** The signaling role of mitochondria calcium transport. *Isi atlas of science: Biochem.* 350-354.

**BRANDT L.; LJUNGGREN B.; SÄVELAND H.; ANDERSSON K. E. y VINGE E. (1986).** Cerebral vasospasm and calcium channel blockade. *Acta Pharmacol. Tox.* 58: 151-155.

**BRAQUET P.; SENN N.; ROBIN J. P.; ESANU A.; GODFRAIND T. y GARAY R. (1986).** Inhibition of the erythrocyte  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ - pump by mammalian lignans. *Pharmacol. Res. Commun.* 18: 227-239.

**BRICKMAN A. S.; NYBY M. D.; VON HUNGEN K.; EGGENA P. y TUCK M. L. (1990).** Calcitropic hormones, platelet calcium, and blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 16: 515-522.

**BRIDGE J. H. B.; SMOLLEY J. R. y SPITZER K. W. (1990).** The relationship between charge movements associated with  $\text{I}_{\text{Ca}}$  and  $\text{I}_{\text{Na-Ca}}$  in cardiac myocytes. *Science* 248: 376- 378.

**BRODERICK R. y SOMLYO A. P. (1987).** Calcium and magnesium transport by in situ mitochondria: electron probe analysis of vascular smooth muscle. *Cir. Res.* 61: 523- 530.

**BROGDEN R. N.; TODD P. A. y SORKIN E. M. (1988).** Captopril, an update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs* 36: 540-600.

**BROWN M. y BIRNBAUMER L. (1990).** Ionic channels and their regulation by G proteins subunits. *Ann. Rev. Physiol.* 52:197-213.

**BRUNER C. A. y WEBB R. C. (1990).** Increased vascular reactivity to Bay K 8644 in genetic hypertension. *Pharmacology* 41: 24-35.

**BRUSCHI G.; BRUSCHI P. C.; REGOLISTI G. y BORGHETTI A. (1988).** Increased sensitivity to protein kinase C activation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 6: S248-S251.

**BÜHLER F. R.; RESINK T. J; TKACHUK V. A.; ZSCHANER A.; DIMITROV D.; RAINE A. E. G.; BOLLI P.; MÜLLER F. B. y ERNE P. (1986):** Abnormal cellular calcium regulation in essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: S145-S149.

**BUKOSKI R. D. (1990).** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism of isolated resistance arteries and cultured vascular myocytes of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *J. Hypertension* 8: 37-43.

**BUKOSKI R. D.; XUE H. y McCARRON D. A. (1987).** Effect of  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$  and ionized  $\text{Ca}^{2+}$  on  $^{45}\text{Ca}$  uptake by primary cultures of aortic myocytes of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 1330-1335.

**BUKOSKI R. D.; DE WAN P. y McCARRON D. A. (1989a).**  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$  modifies growth and contractile function of vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertension* 2: 553-556.

**BUKOSKI R. D.; XUE H. y McCARRON D. A. (1989b).** Mesenteric artery contractile properties during dietary calcium manipulation in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *Am. J. Hypertension* 2: 440-448.

**BÜLTMANN R.; KÜGELGEN I. V. y STARKE K. (1993).** Effects of nifedipine and ryanodine on adrenergic neurogenic contractions of rat vas deferents: evidence for a pulse-to-pulse change in  $\text{Ca}^{2+}$  sources. *Br. J. Pharmacol.* 108: 1062-1070.

**CAFFREY J. M.; JOSEPHSON I. R. y BROWN A. M. (1986).** Calcium channels of amphibian stomach and mammalian aorta smooth muscle cells. *Biophys. J.* 49: 1237-1342.

**CALLEWAERT G. (1992).** Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovasc. Res.* 26: 923-932.

**CALVO-GOMEZ C.; LADO-LADO F. L.; CINOS-RAMOS L.; PEREZ-LEIROS P. y JUSTO-FIRVIDA E. (1992).** The efficacy of nicardipine in treating arterial hypertension in elderly patients. A multicenter outpatient study. *An. Med. Interna* 9: 170-174.

**CAMPBELL K. P.; LEUNG A. T. y SHARP A. H. (1988).** The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine calcium channel. *Trends Neurosci.* 11: 425-430.

**CANESSA M.; ADRAGNA N.; SOLOMON H.; CONNOLLY T. y TOSTESON D. C. (1980).** Increases sodium-lithium counter transport in red cells of patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 302: 772-776.

**CANTLEY L. (1986).** Ion transport systems sequenced. *Trends Neurosci.* 9: 1-3.

**CAPLAN R. A.; GERRITY R. G. y SCHWARTZ C. J. (1974).** Endothelial cell morphology in focal areas of in vivo Evans blue uptake in young pig aorta. *Exp. Mol. Pathol.* 21: 102-117.

**CAPUCCIO F. P.; MARKANDU N. D.; SINGER D. R. J.; SMITH S. J.; SHORE A. C. y MCGREGOR G. A. (1987):** Does oral calcium blood pressure. A double blind study. *J. Hypertension* 5: 67-71.

**CARRIER G. O.; JACKSON C. V. y OWEN M. P. (1979).** Influence of age on norepinephrine-induced vascular contractions as a function of extracellular calcium. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 26: 433-46.

**CASSIE N. J.; CROSS M. A.; PHELAN E. L. y MILLAR J. A. (1990).** Sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  and the effects of a calcium channel antagonist in resistance vessels from two strains of genetically hypertensive rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16: S12-S13.

**CASTEELS R.; DROOGMANS G. y MISSAIAEN L. (1990).** Agonist-induced entry of  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle cells. *Neurochem. Int.* 17: 297-302.

**CATTANEO E. A.; RINALDI G. J. y CINGOLANI H. E. (1990).** Effect of calcium antagonists on aorta isolated from normotensive and hypertensive rats: relaxation and calcium influx blockade. *Can. J. Cardiol.* 6: 212-218.

**CATTERALL W. A. (1988).** Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.

- CAUVIN C.; HWANG B. S.; YAMAMOTO M. y VAN BREEMEN C. (1987).** Effects of dihidropyridines on tension and calcium-45 influx in isolated mesenteric resistance vessels from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Am. J. Cardiol.* 59: 116B-122B.
- CAUVIN C.; LOUTSENHISER R. y VAN BREEMEN C. (1983).** Mechanism of calcium-antagonist induce vasodilation. *Ann. Rev. Pharmacol.* 23: 373-396.
- CAVALIE A.; PELZER D. y TRAUTWEIN W. (1985).** Modulation of gating properties of single calcium channels by D600 in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol* 358: 59.
- CAVERO I. y SPEDDING M. (1983).** Calcium antagonists: a class of drugs with a bright future. Part I: Cellular calcium homeostasis and calcium as a coupling messenger. *Life Sci.* 33: 2571.
- CHAND N.; ALTURA B. M. (1981).** Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: role in lung vascular diseases. *Science* 213: 1376.
- CHALOVICH J. M. (1992).** Actin mediated regulation of muscle contraction. *Pharmacol. Ther.* 55: 95-148.
- CHEN G. F. y CHEUNG D. W. (1992).** Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circ. Res.* 70: 257-63.
- CHEN G. F.; SUZUKI H. y WESTON A. H. (1988).** Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 95: 1165-1174.
- CHEN Q. y VAN BREEMEN C. (1992).** Function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. En: *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. Ed. Putney J W Jr. Raven Press. New York. pp: 335-350.
- CHERRY P. D.; FURCHGOTT R. F.; ZAWADSKI J. V. y JOTHIANANDAN D. (1982).** Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 2106-2110.
- CHEUNG D. W. (1985).** The effects of BAY K 8644 on contraction mediated by  $\alpha$ -adrenoceptors in the rat saphenous vein. *Brit. J. Pharmacol.* 85: 317-319.
- CHINELLATO A.; PANDOLFO L.; RAGAZZI E.; ZAMBONIN M. R.; FROLDI G.; DE BIASI M.; CAPARROTTA L. y FASSINA G. (1991).** Effect of age on rabbit aortic responses to relaxant endothelium-dependent and

endothelium-independent agents. *Blood Vessels* 28: 358-365.

**CHIU A. T.; BOZART J. M. y TIMMERMANS P. B. M. W. M. (1987).** Relationship between phosphatidylinositol turnover and Ca mobilization induced alpha-1 adrenoceptor stimulation in the rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 123-127.

**CHOBANIAN A. V.; LICHTENSTEIN A. H.; NILAKHE V.; HAUDENSCHILD C. C.; DRAGO R. y NICKERSON C. (1989).** Influence of hypertension on aortic atherosclerosis in the watanabe rabbit. *Hypertension* 14: 203-209.

**CHOBANIAN A. V.; BRECHER P. I. y HAUDENSCHILD C. C. (1986).** Effects of hypertension and of antihypertensive therapy on atherosclerosis. *Hypertension* 8: 15-21.

**CLOZEL M.; KUHN H., HEPTI F. y BAUMGARTNER M. R. (1991).** Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension, effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension* 18: 132-141.

**COHEN R. A.; SHEPHERD J. T. y VANHOUTTE P. M. (1983).** 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 245: H1073-H1076.

**COHEN R. A.; SHEPHERD J. T. y VANHOUTTE P. M. (1984).** Endothelium and asymmetrical responses of the coronary arterial wall. *Am. J. Physiol.* 247: H403-H408.

**COLLINS P.; GRIFFITH T. M.; HENDERSON A. H. y LEWIS M. J. (1986).** Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. *J. Physiol.* 381: 427-437.

**COLLINS P.; HENDERSON A. H.; LANG D. y LEWIS M. J. (1988).** Endothelium-derived relaxing factor and nitroprusside compared in noradrenaline and K<sup>+</sup>-contracted rabbit and rat aorta. *J. Physiol.* 400: 395-404.

**CONNOLLY M.; BROSS T. E. y MAFERNS P. W. (1985).** Isolation of phosphomonoesterase from human platelets that specifically hydrolyzes the 5-phosphate of inositol 1,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 260: 7868-7874.

**CONTI M. y ALDELSTEIN R. S. (1981).** The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3:5-c AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3178 - 3181.

- CORVOL P.; CLAUSER E. y WAEBER B. (1989).** Circulating and tissular renin-angiotensin systems. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14: V-VI.
- COX R. H. y KIKTA D. C. (1992).** Age-related changes in thoracic aorta of obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 262: H1548-H1556.
- CRESPO L. M.; GRANTHAM C. J. y CANNELL M. B. (1990).** Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* 345: 618-21.
- DAHL L. K.; KNUDSEN K. D.; HEINE M. y LEITL G. (1967).** Effects of chronic excess salt ingestion: genetic influence on the development of salt hypertension in parabiotic rats: evidence for a humoral factor. *J. Exp. Med.* 126: 687-699.
- DANIEL E. E. (1985).** The use of subcellular membrane fractions in analysis of control of smooth muscle function. *Experientia* 41: 905-913.
- DANTHULURI N. R. y DETH R. C. (1984).** Phorbol ester-induced contraction of arterial smooth muscle and inhibition of  $\alpha$ -adrenergic response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 1103-1109.
- DAWSON A. P. e IRVINE R. F. (1984).** Inositol 1,4,5-triphosphate-promoted  $\text{Ca}^{2+}$  release from microsomal fractions of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 858-864.
- DE LANEROLLE P. y PAUL R. J. (1991).** Myosin phosphorylation/dephosphorylation and regulation of airway smooth muscle contractility. *Am. J. Physiol.* 261: L1-L14.
- DE WARDENER H. E. y MCGREGOR G. A. (1983).** The relation to a circulating transport inhibitor (the natriuretic hormone) to hypertension. *Medicine* 62: 310-326.
- DE CHAMPLAIN J. (1990).** Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J. Hypertension* 8: S77-S85.
- DE MEY J. G. y GRAY S. D. (1985).** Endothelium-dependent reactivity in resistance vessels. *Prog. Appl. Microcir.* 8: 181.
- DE MEY J. G. y VANHOUTTE P. M. (1982).** Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium. *Cir. Res.* 51: 439-447.



- DENTON R. M. y McCORMACK J. G. (1990).**  $\text{Ca}^{2+}$  as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 451-66.
- DEVYNCK M. A.; PERNOLLET M. G.; NUNEZ A. M.; ARAGON I.; MONTENAY-GARESTIER T.; HELENE C. y MEYER P. (1982).** Diffuse structural alterations in cell membranes of spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 5057- 5460.
- DEVYNCK M. A.; PERNOLLET M. G.; RONSEFELD J. B. y MEYER P. (1983).** Measurement of digitalis like compound in plasma. Application in studies of essential hypertension. *Br. Med. J.* 287: 631-634.
- DILLON J. S.; GU X. T. y NAYLER W. G. (1989).** Effect of age and of hypertrophy on cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist binding sites. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14: 233-240.
- DOCHERTY J. R. (1986).** Aging and the cardiovascular system. *J. Auton. Pharmacol.* 6: 77-84.
- DOCHERTY J. R. (1988).** The effects of ageing on vascular alpha-adrenoceptors in pithed rat and rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 146: 1-5.
- DOHERTY A. M. (1991).** Endothelin: a new challenge. *Am. Chem. Soc.* 35: 1493-1508.
- DOHI Y.; THIEL M. A.; BÜHLER F. R. y LÜSCHER T. F. (1990).** Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. *Hypertension* 15: 170-179.
- DOMINICZAK A. F. y BOHR D. F. (1990).** Cell membrane abnormalities and the regulation of intracellular calcium concentration in hypertension. *Clin. Sci.* 79: 415-423.
- DONG Y. J. y WADSWORTH R. M. (1986).** Effects of drugs that activate or inhibit calcium channels on contraction of the aorta from hypertensive rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: 1176-1184.
- DOWNES P. y MICHELL R. H. (1982).** Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: lipids in search of a function. *Cell Calcium*, 3: 467-502.
- DUCKLES S. P. (1987).** Influence of age on vascular adrenergic responsiveness. *Blood Vessels.* 22: 172-178.
- DUFILHO D. M.; MILLANVOYE-VAN BRUSSEL E.; FREYSS-BEGUIN M.;**

- ASTARIE C. y DEVYNCK M. A. (1992).** Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and pH in cultured cardiac myocytes and fibroblasts from newborn hypertensive rats of the Okamoto strain. En: Genetic Hypertension 218: 569-571.
- DZAU V. J. (1989).** Short and long-term determinants of cardiovascular function and therapy: contributions of circulating and tissue renin-angiotensin systems. J. Cardiovasc. Pharmacol. 14: S1-S5.
- EBASHI S. y OGAWA Y. (1988).**  $\text{Ca}^{2+}$  in contractile processes. Biophys. Chem. 29: 137-143.
- EGGERMONT J. A.; VROLIX M.; RAEYMAEKERS L.; WUYTACK F. y CASTEELS R. (1988).**  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPases of vascular smooth muscle. Cir. Res. 62: 266-278.
- EHLERT F. J.; ROESKE W. R.; ITOGA E. y YAMAMURA H. I. (1982).** The binding of [ $^3\text{H}$ ] nitrendipine to receptors for calcium antagonist channel in the heart, cerebral cortex and ileum rats. Life Sci. 30: 2191-2202.
- ELLIS S. B.; WILLIAMS M. E.; WAYS N. R.; BRENNER R.; SHARP A. H.; LEUNG A. T.; CAMPBELL K. P.; McKENNA E.; KOCH W. J.; HUI A.; SCHWARTZ A. y HARPOLD M. M. (1988).** Sequence and expression of mRNAs encoding the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of a DHP-sensitive calcium channel. Science 241: 1661-1664.
- ENCABO A.; FERRER M.; MARIN J.; VILLAMOR J. y BALFAGON G. (1992).** Vasoconstrictive responses elicited by endothelin in bovine cerebral arteries. Gen. Pharmacol. 23: 263-267.
- ENGLAND P. J. (1986).** Intracellular calcium receptor mechanisms. Br. Med. Bull. 42: 375-383.
- EPSTEIN S.; ROSING D. y CONTI C. (1985).** Calcium channel blockers: present status and future directions. Am. J. Cardiol. 55: 1-214.
- ERLICH B. E. y WATRAS J. (1988).** Inositol 1,4,5-triphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. Nature 336: 583-586.
- ERNE P.; BOLLI P.; BÜRGISSER E. y BÜHLER F. R. (1984).** Correlation of platelet calcium with blood pressure: effect of antihypertensive therapy. New Engl. J. Med. 310: 1084-1088.
- ERNE P. y HERMSMEYER K. (1989).** Intracellular vascular smooth muscle calcium modulation in genetic hypertension. Hypertension 14: 145-151.

**FELETOU M. y VANHOUTTE P. M. (1988).** Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 93: 515-524.

**FERNANDEZ-ALFONSO M. S.; ALONSO M. J.; RICO I.; SALAICES M.; y MARIN J. (1988).** Effects of the  $\text{Ca}^{2+}$  agonists, Bay K 8644 and CGP 28392, on isolated cat cerebral and peripheral arteries. *Brain Res.* 474: 147-154.

**FERRARIO C. M. (1990).** The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15: S1-S5.

**FERRY D. R. y GLOSSMANN N. (1982).** Evidence for multiple receptors sites within the putative calcium channel. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 321: 80-83.

**FLECKENSTEIN A. (1970).** Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and the role in the production of myocardial lesions. En: *Calcium and the heart*. Eds: Harris P. y Opie L. Academic Press pp: 135-188.

**FLECKENSTEIN A. (1985).** Calcium antagonists and calcium agonists: fundamental criteria and classification. En: *Cardiovascular Effects of Dihydropyridine-Type Calcium Antagonists and Agonists*. Bayer Symposium IX. Springer, Berlin. pp: 3-31.

**FLEISCH J. H. (1980).** Age-related changes in the sensitivity of blood vessels to drugs. *Pharmacol. Ther.* 8: 477-487.

**FOLSOM A. R.; SMITH C. L.; PRINEAS R. J. y GRIMM R. H. (1986):** Serum calcium fractions in essential hypertensive and matched normotensive subjects. *Hypertension* 8: 11-15.

**FOUDA A. K. L. y ATKINSON J. (1986).** Sensitivity to noradrenaline and electrical stimulation decreases with age in the rat tail artery. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 334: 37-39.

**FOX A. P., NOWYCKY M. C. y TSIEN R. W. (1987a).** Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394: 149-172.

**FOX A. P.; NOWYCKY M. C. y TSIEN R. W. (1987b).** Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394: 173-200.

**FOZARD J. R. y PART M. L. (1991).** Haemodynamic responses to  $\text{N}^{\text{G}}$ -

monomethyl- L-arginine in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. Br. J. Pharmacol. 102: 823-826.

**FRANCKOWIACK G.; BECHEM M.; SCHRAMM M. y THOMAS G. (1985).** The optical isomers of the 1,4-dihidropyridine Bay K 8644 show opposite effects on  $Ca^{++}$  channels. Eur. J. Pharmacol. 114: 223-226.

**FRIEDMAN S. M. (1982).** Sodium ions and regulation of vascular tone. Adv. Microcirc. 11: 20-42.

**FRIEDMAN M. E.; SUAREZ-KURTZ G.; KACZOROWSKI G. J.; KATZ G. M y REUBEN J. P. (1986).** Two calcium currents in a smooth muscle cell line. Am. J. Physiol. 250: H699 -H703.

**FURCHGOTT R. F. y ZAWADZKI J. V. (1980).** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373-376.

**FURSPAN P. B.; RINALDI G. J.; HOFFMAN K. y BOHR D. F. (1989).** Dietary calcium and cell membrane abnormality in genetic hypertension. Hypertension 13: 727-730.

**GARDINER S. M.; COMPTON A. M.; BENNETT T.; PALMER R. M. J. y MONCADA S. (1990).** Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. Hypertension 15: 486-492.

**GELBAND C. H. y HUME J. R. (1992).** Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. Circ. Res. 71: 745-758.

**GENNARI C.; NAMI R.; BIANCHINI C.; PAVESE G.; LUCANI B. y PERRONE A. F. (1986).** Renal excretion of calcium in human hypertension. Am. J. Nephrol. 6: 124-127.

**GHALAYANI A. y EICHBERG J. (1985).** purification of phosphatidylinositol synthetase from rat brain by CDP- diacylglycerol affinity chromatography and properties of the purified luzyme. J. Neurochem. 44. 175- 182.

**GIL-LONGO J.; ORALLO F.; VERDE I.; CAMPOS M, y CALLEJA J. M. (1992).** Role of the endothelial system in BAY K 8644 enantiomer and nifedipine vasomodulator actions in rat aorta. Eur. J. Pharmacol. 221: 1-8.

**GILLESPIE J. S. y SHENG J. O.; McMURTRY I. F. y O'BRIEN R. F. (1990).** The effects of pyrogallol and hidroquinone on the response to NANC nerve stimulation in the rat anococcygeus and the bovine retractor penis muscles. Br. J.

Pharmacol. 99: 194-196.

**GLOSSMANN H. y FERRY D. R. (1983).** Solubilization and partial purification of putative calcium channels labelled with <sup>3</sup>H-nimodipine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323: 279-291.

**GLOSSMAN H.; FERRY D. R.; LUBBECKE F.; MEWES R. y HOFMANN F. (1982).** Calcium channels: Direct identification with radioligand binding studies. Trends Pharmacol. Sci. 3: 431-437 .

**GODFRAIND T. (1987).** Classification of calcium antagonists. Am. J. Cardio. 59: 11B-23B.

**GODFRAIND T y FAGOO M. (1986).** Endogenous digitalis, cardiodigin and other regulators of the sodium pump. En: Cardiac glycosides 1785-1985. Eds. Erdemann E.; Greeff K. y Skou J C. Steinkopff Verlag, Darmstadt. pp: 143-155.

**GODFRAIND T. y KABA A. (1969).** Inhibition by cinnarizine and chlorpromazine of the contraction induce by calcium and adrenaline in vascular smooth muscle. Br. J. Pharmacol. 35: 354-355.

**GODFRAIND T.; MOREL N. y WIBO M. (1990).** Modulation of the action of calcium antagonists in arteries. Blood Vessels. 27: 184-196.

**GODFRAIND T.; SALOMONE S.; DESSY C.; VERHELST B.; DION R. y SCHOEVAERTS J. C. (1992).** Selectivity scale of calcium antagonists in the human cardiovascular system based on in vitro studies. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20: S34-S41.

**GOPALAKRISHNAN V.; PARK L. E. y TRIGGLE C. R. (1985).** The effects of the calcium channel agonist Bay K 8644 on human vascular smooth muscle. Eur. J. Pharmacol. 113: 447-451.

**GOLDSTEIN D. S. (1983).** Plasma catecholamines and essential hypertension: an analytical review. Hypertension 5: 86-89.

**GOLIK A; KADAR T.; RAVEH L.; MODAI D. y WEISSMAN B. A. (1992).** Aging does not alter the binding characteristics to voltage dependent calcium channels in the brain of CW1 mice. J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. 3: 109-118.

**GOTO T.; SATOH K. y TAIRA N. (1985).** Bay K 8644, a dihydropyridine calcium agonists vasoconstrictor responses to endogenous and exogenous noradrenaline in the peripheral vasculature of the dog. Br. J. Pharmacol. 85: 913-916.

**GOULD R. M.; SPIVACK W. D.; ROBERTSON D. y POZNANSKY M. J. (1983).** Phospholipid synthesis in the squid giant axon: enzymes of phosphatidylinositol metabolism. *J. Neurochem.* 40: 1300-1306.

**GRAMMAS P.; GIACOMELLI F.; BESSER D.; DIGLIO C. y WIENER J. (1991).** Calcium and the impairment of contractions to norepinephrine in aorta isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hypertension* 13: 1357-70.

**GREENBERG S. y DIECKE F. P. J. (1988).** Endothelium-derived relaxing and contracting factors : new concepts and new findings. *Drug Develop. Res.* 12 : 131-149.

**GRIFFITH T. M.; EDWARDS D. H.; NEWBY A. C.; LEWIS M. J. y HENDERSON A. H. (1986).** Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovasc. Res.* 20: 7-12.

**GRUETER C. A.; GRUETTER D. Y.; LYON J. E.; KADOWITZ P. J. y IGNARRO L. J. (1981).** Relationship between cyclic GMP formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 181-186.

**GUAN Y. Y. y KWAN C. Y. (1989).** Abnormal contractile response of aortas from spontaneously hypertensive rats to  $\text{Ca}^{2+}$  after depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Ca}^{2+}$  free medium. *Am. J. Hypertension* 2: 643-646.

**GUNTER T. E. y PFEIFFER D. R. (1990).** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258: C 755-C 786.

**GUYTON J. R.; DAO D. T.; LINDSAY K. L. y TAYLOR A. A. (1990).** Ultrastructure of hypertensive rat aorta. Increased basement membrane-like material. *Hypertension* 15: 56-57.

**HABER E. y HAUPERT G. T. (1987).** The search for a hypothalamic  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase inhibitor. *Hypertension* 9: 315-324.

**HADDY F. J. y PAMNANI M. B. (1985).** Evidence for a circulating endogenous  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump inhibitor in low-renin hypertension. *Fed. Proc.* 44: 2789-2794.

**HAGIWARA S.; IRISAWA H. y KAMEYAMA M. (1988).** Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 395: 233-253.

**HANSEN O. y CLAUSEN T. (1988).** Quantitative determination of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase and other sarcolemmal components in muscle cells. *Am. J. Physiol.* 254: C1-C7.

**HANSFORD R. G. (1985).** Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 102: 1-72.

**HARDER D. R. (1987).** Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Cir. Res.* 60: 102-107.

**HARRIS R. (1975).** Cardiac changes with age. En: *The physiology and pathology of human aging*. Eds: Goldmasn R. y Rockstein M. New York. Academic Press. pp: 109-122.

**HARSTORNE D. J. (1987).** Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed. Johnson L. R. New York. Raven Press. pp: 423-482.

**HAUDENSCHILD C. C.; PRESCOTT M. F. y CHOBANIAN A. V. (1979).** Effects of hypertension and its reversal on aortic intima lesions of the rat. *Hypertension* 2: 33-44.

**HAYASHI S. y TODA N. (1978).** Age-related changes in the response of rabbit isolated aortae to vasoactive agents. *Br. J. Pharmacol.* 64: 229-237.

**HAYNES G. W. y WEBB D. J. (1993).** The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease?. *Clinical Science* 84: 485-500.

**HEAGERTY A. M.; OLLERENSHAW J. D. y SWALES J. D. (1986).** Abnormal vascular phosphoinositide hydrolysis in the spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.* 89: 803-807.

**HEFFEZ D. S. y PASONNEAU J. V. (1985).** Effect of nimodipine on cerebral metabolism during ischaemia and recirculation in the mongolian gerbil. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 523-528.

**HEISTAD D. D.; LOPEZ A. G. y BAUMBACH G. L. (1991).** Hemodynamic determinants of vascular changes in hypertension and atherosclerosis. *Hypertension* 17: III7-III11.

**HERMSMEYER K. (1991).** Differences of calcium channels in vascular muscle in hypertension. *Am. J. Hypertension* 4: S412-S415.

**HERMSMEYER K. y RUSCH N. J. (1989).** Calcium channel alterations in

genetic hypertension. *Hypertension* 14: 453-456.

**HERTLE L. y NAWRATH H. (1989).** Stimulation of voltage-dependent contractions by calcium channel activator Bay K 8644 in the human upper urinary tract in vitro. *J. Urol.* 141: 1014-1018.

**HESS P.; LANSMAN J. B. y TSIEN R. W. (1984).** Different modes of Ca channel gating behaviour favoure by dihidropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311: 538-544.

**HOEFFNER Y. y VANHOUTTE P. M. (1989).** Increases in flow reduce the release of endothelium-derived relaxing factor in the aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertension* 2: 762-767.

**HÖGESTATT E. D. y ANDERSON K. E. (1984).** Mechanisms behind the biphasic contractile response to potassium depolarization in isolated rat cerebral arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 187-195.

**HOLCK M. I. (1988).**  $\alpha_1$ -Adrenoceptor reserve and effects of a  $\text{Ca}^{2+}$  entry blocker (Ro 183981) on aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 9-15.

**HONGO K.; NAKAGOMI T.; KASSELL N. F.; SASAKI T.; LEHMAN M.; VOLLMER D. G.; TSUKAHARA T.; OGAWA H. y TORNER J. (1988).** Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke* 19: 892-897.

**HOOTMAN S. R.; BROWN M. E. y WILLIAMS J. A. (1987).** Phorbol esters and A23187 regulate Na-K pump activity in pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 252: G499-G505.

**HOUSTON D. S.; SHEPHERD J. T. y VANHOUTTE P. M. (1985).** Adenine nucleotides, serotonin and endothelium-dependent relaxations to platelets. *Am. J. Physiol.* 248: H389-H395.

**HUANG C. L.; COGAN M. G.; CRAGOE E. J. Jr. y IVES H. E. (1987).** Thrombin activation of the Na/H exchanger in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262: 14134-14140.

**HULTHEN U. L.; BOLLI P.; AMANN F. W.; KIOWSKI W. y BÜHLER F. R. (1982).** Enhanced vasodilation in essential hypertension by calcium channel blockade with verapamil. *Hypertension* 4: II26-II31.

**HURWITZ L. (1986).** Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann.*



Rev. Pharmacol. Toxicol. 26: 225-258.

**HYLAND L.; WARNOCK P. y DOCHERTY J. R. (1987).** Age-related alterations in alpha 1-and beta-adrenoceptors mediated responsiveness of rat aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 335: 50-53.

**HYNES M. R. y DUCKLES S. P. (1987).** Effect of increasing age on the endothelium-mediated relaxation of rat blood vessels in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 387-392.

**IGNARRO L. J.; BURKE T. M.; WOOD K. S.; WOLIN M. S. y KADOWITZ P. J. (1984).** Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. J. Pharmacol. Exp. Ther. 28: 682-690.

**IIMURA O.; KIRUCHI K. y SATO S. (1984).** Plasma noradrenaline concentration and pressor response to infused noradrenaline in patients with borderline hypertension and mild or moderate essential hypertension. Jpn. Circ. J. 48: 159-167.

**IKEBE M. y REARDON S. (1989).** Phosphorylation of smooth myosin light chain kinase by smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. J. Biolog. Chemistry 265: 8975-8978.

**INOUE A. ; YANAGISAWA M.; SIMURA S.; KASUYA Y.; MIYAUCHI T.; GOTO K. y MASAKI T. (1989).** The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides preditec by three separate genes. Proc. Natul. Acad. Sci. U S A. 86: 2863-2867.

**IRVINE R. F. (1986).** Calcium transients: mobilization of intracellular calcium. Br. Med. Bull. 42: 369-374.

**IRVINE R. F. (1990).** "Quantal"  $\text{Ca}^{2+}$  release and the control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inositol phosphates a possible mechanism. FEBS lett. 263: 5-9.

**JACKSON E. K. (1989).** Defective modulation of noradrenergic neurotransmission by endogenous prostaglandins in aging spontaneously hypertensive rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 250: 9-21.

**JAMESON M.; LÜSCHER T.; SKOPEC J.; DIEDERICH A. y DIEDERICH D. (1990).** Impaired endothelium dependent relaxation in mesenteric resistance arteries of prehypertensive SHR rat. Kidney Int. 37: 387 ( Abstract).

**JANIS R. A.; BELLEMANN P.; SARMIENTO J. G. y TRIGGLE D. J. (1985).** The dihydropyridine receptors. Bayer-Symposium IX. Cardiovascular effects of

dihydropyridine-type calcium antagonists and agonists. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp: 140-155.

**JANIS R. A. y TRIGGLE D. J. (1984).** 1,4-Dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists and activators: a comparison of binding characteristics with pharmacology. *Drug Dev. Res.* 4: 257-274.

**JELICKS L. A. y GUPTA R. K. (1990).** NMR measurement of cytosolic free calcium, free magnesium and intracellular sodium in the aorta of the normal and spontaneously hypertensive rat. *J. Biol. Chem.* 265: 1394-1400.

**JMARI K.; MIRONNEAU C. y MIRONNEAU J. (1986).** Canaux calciques des cellules musculaires lisses. *J. Physiol. (Paris)* 81: 168-176.

**JOHNSON M. L.; ELY D. L. y TURNER M. E. (1992).** Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 19: 425-427.

**JONHS A.; LEISTEN P.; YAMAMOTO H.; HWANG K. y VAN BREEMEN C. (1987).** Calcium regulation of vascular smooth muscle contractility. *Am. J. Cardiol.* 59: 18A-23A.

**JULIUS S. (1988).** The therapeutic dilemma of hypertension in the elderly. *Drugs* 36: 7-17.

**KANAIDE H.; KOBAYASHI S.; NISHIMURA J.; HASEGAWA M.; SHOGAKIUCHI Y.; MATSUMOTO T. y NAKAMURA M. (1988).** Quin 2 microfluorometry and effects of verapamil and diltiazem on calcium release from rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Cir. Res* 63: 16-26.

**KANMURA Y.; ITOH T. y KURIYAMA H. (1984).** Agonist actions of BAY K 8644, a dihydropyridine derivative, on the voltage-dependent calcium influx in smooth muscle cells of the rabbit mesenteric artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231: 717-723.

**KARAKI H.; NAKAGAWA H. y URAKAWA N. (1984).** Comparative effects of verapamil and sodium nitroprosside on contraction and  $^{45}\text{Ca}$  uptake in smooth muscle of rabbit aorta, rat aorta and guinea pig taenia coli. *Br. J. Pharmacol.* 81: 393-400.

**KASUYA Y.; ISHIKAWA T.; YANAGISAWA M.; KIMURA S.; GOTO K. y MASAKI T. (1989).** Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.* 257: H1 828-835.

**KATUSIC Z. S.; SHEPHERD J. T. y VANHOUTTE P. M. (1984).** Vasopressin

causes endothelium-dependent relaxations of canine basilar artery. *Circ. Res.* 55: 575-579.

**KATUSIC Z. S.; SHEPHERD J. T. y VANHOUTTE P. M. (1986).** Endothelium-dependent contractions to stretch in canine basilar arteries. (Abstract) *Fed. Proc.* 45: 289.

**KATUSIC Z. S.; SHEPHERD J. T. y VANHOUTTE P. M. (1988).** Potassium-induced endothelium-derived rhythmic activity in the canine basilar artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12: 37-41.

**KAUSER K.; STEKIEL W. J.; RUBANYI G. y HARDER D. R. (1989).** Mechanism of action of EDRF on pressurized arteries: effect on K<sup>+</sup> conductance. *Circ. Res.* 65: 199-204.

**KAZDA S.; GARTHOFF B. y KNORR A. (1983).** Nitrendipine and other calcium entry blockers (calcium antagonists) in hypertension. *Fed. Proc.* 42: 196-200.

**KAZDA S. B.; GARTHOFF B. y KNORR A. (1985).** Interference of the calcium antagonist nisoldipine with the abnormal response of vessels from hypertensive rats to  $\alpha$ -adrenergic stimulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7: S61-S65.

**KEVIN P.; CAMPBELL A. T.; LEUNG y SHARP A. H. (1988).** The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Pharmacol. Sci.* 5.

**KHALIL R.; GHONEIN M. A. y ELHILALI M. M. (1987).** Mechanism of calcium activation in vascular smooth muscle. *J. Hypertension* 5: S5-S15.

**KHALIL R.; LODGE N. J.; SAIDA K.; GELBAND C. H. y VAN BREEMEN C. (1990).** Calcium metabolism in vascular smooth muscle and its relevance to the etiology of hypertension. En: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Eds: Laragh J H. y Brenger B M. Raven Press. New York. pp: 547-653.

**KHATTER J. C. y NAVARATNAM S. (1992).** Enhancement in myocardial inotropic response to BAY K 8644 with advancing age. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 351-355.

**KIKAWA K.; MURATA S. y NAGAO T. (1989).** Endothelium-dependent calcium-induced relaxation in the presence of Ca<sup>2+</sup>-antagonists in canine depolarized coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 98: 700.

**KIRBER M. T.; SINGER J. J. y WALSH J. V. (1987).** Stretch-activated channels

in freshly dissociated smooth muscle cells. (Abstract). *Biophys. J.* 51: 552.

**KIRTLEY M. E.; SUMBILLA C. y INESI G. (1990).** Mechanisms of calcium uptake and release by sarcoplasmic reiculum. *Intracellular calcium regulation*. En: *Intracellular calcium regulation*. Eds: A. L. Liss. pp: 249-270.

**KLOOG Y. y SOKOLUVSKY M. (1989).** Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 212-214.

**KOBAYASHI Y. y HATTORI K. (1990).** Nitroarginine inhibits endothelium-dependent relaxation. *Jpn. J. Pharmacol.* 52: 167-169.

**KOBAYASHI Y.; IKEDA K.; SHINOZUKA K.; NARA Y.; YAMORI Y. y HATTORI K. (1992).** Endothelium-dependent and independent vasodilations of stroke-prone spontaneously hypertensive rats with stroke. *Genetic Hypertension* 218: 51-53.

**KOBAYASHI S.; KANAIDE A. y NAKAMURA M. (1985).** Cytosolic free calcium transients in cultivated vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 877-884.

**KOCH P.; WILFFERT B.; WILHELM D. y PETERS T. (1990).** An approach to differentiate between noradrenaline-elicited contractile processes in the rat isolated aorta. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 342: 454-461.

**KOGA T.; TAKATA Y.; KOBAYASHI K.; TAKISHITA S.; YAMASHITA Y. y FUJISHIMA M. (1988).** Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 6: S243-S245.

**KOGA T.; TAKATA Y.; KOBAYASHI K.; TAKISHITA S.; YAMASHITA Y. y FUJISHIMA M. (1989).** Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to actylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 14: 542-548.

**KOJIMA M.; ASANO M.; AOKI K.; YAMAMOTO M. y MATSUDA T. (1989).** Decrease in alpha 1-adrenoceptor reserve in mensenteric arteries isolated from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 7: 873- 878.

**KOKUBUN S. y REUTER H. (1984).** Dihidropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4824-4827.

**KOMORI K.; LORENZ R. R. y VANHOUTTE P. M. (1988).** Nitric oxide, Ach,

and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 255: H207-H212.

**KOMORI K. y SUZUKI H. (1987a).** Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Cir. Res.* 61: 586-593.

**KOMORI K. y SUZUKI H. (1987b).** Heterogeneous distribution of muscarinic receptors in the rabbit saphenous artery. *Br. J. Pharmac.* 92: 657-664.

**KONDO K.; OKUNO T.; KONISHI K.; SARUTA T. y KATO E. (1979).** Effects of potassium and ouabain on the vascular reactivity to norepinephrine in the rat mesenteric artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 908-912.

**KONISHI M. y SU C. (1983).** Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5: 881-886.

**KOUTOUZOV S.; REMMAL A.; MEYER P. y MARCHE P. (1988).** Relationship between enhanced phosphoinositide turnover and cellular responses in platelets from spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11: S6-S9.

**KOUTOUZOV S.; MARCHE P.; GIRARD A. y MEYER P. (1983).** Altered turnover of polyphosphoinositides in the erythrocyte membrane of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 5: 409-414.

**KOWARSKI S.; COWEN L. A. y SCHACHTER D. (1986).** Decreased content of integral membrane calcium-binding protein (IMCAL) in tissues of the spontaneously hypertensive rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 1097-1100.

**KUBO T.; FUJTE K.; YAMASHITA M. y MISU Y. (1981).** Antihypertensive effects to nifedipine on conscious normotensive and hypertensive rats. *J. Pharmacol. Dyn.* 4: 294-300.

**KURODA K.; FUKUDA Y.; NAKAO K. y INUKAI T. (1991).** Effects of felodipine on vascular smooth muscle in comparison with nifedipine. *Arzneimittelforschung* 41: 709-714.

**KURYYAMA S.; DENNY T. N. y AVIV A. (1988).**  $^{22}\text{Na}^+$  and  $^{86}\text{Rb}^+$  transport in vascular smooth muscle of SHR, Wistar-Kyoto and Wistar rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11: 722-729.

**LAHER I.; HWA J. J. y BEVAN J. A. (1988).** Calcium and vascular myogenic tone. En: *Calcium antagonists, Pharmacology and Clinical Research*. Eds: Paoletti r.; Vanhoutte P. *Proceedings of the Annals of the New York Academy of Sciences*

**LAI F. M.; COBOUZZI A.; SHEPHERD T.; TANIKELLA A.; HOFFMAN A. y CERVONI P. (1989).** Endothelium-dependent basilar and aortic vascular responses in normotensive and coarctation hypertensive rats. *Life Sci.* 45: 607.

**LATTANZIO F. A.; SCHLATTERER R. G.; NICAR M.; CAMPBELL K. P. y SUTKO J. L. (1987).** The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261: 6300-6306.

**LAU K.; ZIKOS D.; SPIRNAK J. y EBY B. (1984).** Evidence for intestinal mechanism in hypercalcyuria of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 247: E625-E633.

**LAU K. y EBY B. (1985).** The role of calcium in genetic hypertension. *Hypertension* 5: 657-667.

**LAWSON K. y CAVERO I. (1989).** (-) Bay K 8644 liberates a contractant factor from the endothelium of the rat aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 3: 687-693.

**LEE K. S.; MARBAN E. y TSIEN R. W. (1985).** Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* 364: 395-411.

**LEE T.; SHIRASAKI Y. y NICKOLS A. G. (1987).** Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. Neurohumoral control of blood vessel tone. *Proc. Int. Symp.* 132-136.

**LEIJTEN P. D. A. y VAN BREEMEN C. (1984).** The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta. *J. Physiol.* 357: 327-339.

**LESH R. E.; MARKS A. R.; SOMLYO A. V.; FLEISCHER S. y SOMYYO A P. (1993).** Anti-ryanodine receptor antibody binding sites in vascular and endocardial endothelium. *Circ. Res.* 72: 481-488.

**LEVER A. F. (1986).** Slow pressor mechanisms in hypertension: a role for hypertrophy of resistance vessels?. *J. Hypertension* 4: 515.

**LEVY B. I.; BENESSIANO J.; POITEVIN P. y SAFAR M. E. (1990).** Endothelium-dependent mechanical properties of the carotid artery in WKY and SHR. Role of angiotensin converting enzyme inhibition. *Cir. Res.* 66: 321-328.

**LEW W. Y.; HRYSHKO L. V. y BERS D. M. (1991).** Dihydropyridine receptors are primarily functional L-type calcium channels in rabbit ventricular myocytes. *Cir.*

Res. 69: 1139-1145.

**LI J. y BUKOSKI R. D. (1993).** Endothelium-dependent relaxation of hypertensive resistance arteries is not impaired under all conditions. *Circ. Res.* 72: 290-296.

**LICHTSTEIN D.; LUTZ R. A.; XU H. y RODBARD D. (1986).** Characterization of two classes of cardiac glycoside binding sites in rat heart and brain membrane preparations, using quantitative computer modelling. *Hypertension* 4: 227-229.

**LINDNER A.; KENNY H. y MEACHAM A. J. (1987).** Effect of a circulating factor in patients with essential hypertension on intracellular free calcium in normal platelets. *New Engl. J. Med.* 316: 509-513.

**LIPE S. MOULDS R. F. (1985).** In vitro calcium dependence of arterial smooth muscle in human hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 12: 319-323.

**LJUNG B. y STAGE D. (1975).** Postnatal ontogenic development of neurogenic and myogenic control in the rat portal vein. *Acta Physiol. Scand.* 94: 112-127.

**LLINAS R.; SUGIMORI M.; LIN J. W. y CHERKSEY B. (1989a).** Blocking and isolation of calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1689-1693.

**LLINAS R.; SUGIMORI M. y CHERKSEY B. (1989b).** Voltage dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P Channel. *Calcium Channels. Structure and Function.* *Annu. Y. Acad. Sci.* 560: 103-111.

**LOCKETTE W.; OTSUKA Y. y CARRETERO O. (1986).** The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 8: II61-II66.

**LOCKETTE W. E.; WEBB R. C.; y BOHR D. F. (1980).** Prostaglandins and potassium relaxation in vascular smooth muscle of the rat. The role of Na-K ATPase. *Circ. Res.* 46: 714-720.

**LOIRAND G.; PACAUD P.; BARON A.; MIRONNEAU C. y MIRONNEAU J. (1991).** Large conductance calcium-activated non-selective cation channel in smooth muscle cells isolated from rat portal vein. *J. Physiol.* 437: 461-475.

**LOIRAND G.; PACAUD P.; MIRONNEAU C. y MIRONNEAU J. (1986).** Evidence for two distinct calcium channels in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflügers Arch.* 407: 566-568.

**LOSSE H.; ZIDEK. W. y VETTER H. (1984).** Intracellular sodium and calcium in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: S32-S34.

**LOUTZENHISER R.; RUÈGG U. T.; HOF A. y COL. (1984).** Studies on the mechanism of action of the vasoconstrictive dihydropyridine CGP 28392. *Eur. J. Pharmacol.* 105: 229-237.

**LOWY J.; POULSEN F. R. y VICBERT P. J. (1970).** Myosin filaments in vertebrate smooth muscle. *Nature* 225: 1053-1054.

**LUCKHOFF A. y CLAPHAM D. E. (1992).** Inositol 1,3,4,5-tetra:phosphate activates an endothelial  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel. *Nature* 355: 356-358.

**LU P. K. y MEANS A. R.(1993).** Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrine Rev.* 14: 40-53.

**LUFT F. C.; GANTEN U.; MEYER D.; STEINBERG H.; GLESS H.; UNGER T. H. y GANTEN D. (1988).** Effect of high calcium diet on magnesium, catecholamines, and blood pressure of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187: 474-481.

**LÜSCHER T. F. (1990).** The endothelium. *Hypertension* 15: 482-485.

**LÜSCHER T. F.; BOULANGER CH. M.; DOHI Y. y YANG Z. (1992).** Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19: 117-130.

**LÜSCHER T. F.; DIEDERICH D.; WEBER E.; VANHOUTTE P. M. y BÜHLER F. R. (1988).** Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 11: 573-578.

**LÜSCHER T. F.; RAIJ L. y VANHOUTTE P. M. (1987).** Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive dahl rats. *Hypertension* 9: 157-163.

**LÜSCHER T. F. y VANHOUTTE P. M. (1986).** Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8: 344-348.

**LÜSCHER T. F.; YANG Z.; DIEDERICH D. y BÜHLER F. R. (1989).** Endothelium-derived vasoactive substances: potencial role in hypertension, atherosclerosis, and vascular occlusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14: S63-S69.

**LYNCH C. J.; STEER M. L.; SMART J. L. y DETH R. C. (1986).** Differences



in the role of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase during  $\alpha_1$ -adrenergic events in rat and rabbit aorta. Pharmacology 33: 221-234.

**MAJNO G.; ZAND T.; NUNNARI J. J.; KOWALA M. C. y JORIS I. (1988).** Intimal responses to shear stress, hypercholesterolemia, and hypertension. En: Endothelial cell biology. Ed: Simionescu N. y Simionescu M. Plenum Publishing Corporation. pp: 349-367.

**MALTA E.; SCHINI V. y MILLER R. C. (1986).** Effect of endothelium on basal and alpha-adrenoceptor stimulated calcium fluxes in rat aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 334: 63-70.

**MANNHOLD R.; RODERKIRCHEN R. y BAYER R. (1982).** Qualitative and quantitative structure activity relationships of specific Ca-Antagonists. Prog. Pharmacol. 5: 25-52.

**MARIN J. (1988).** Vascular effects of calcium antagonists. Uses in some cerebrovascular disorders. Gen. Pharmacol. 19: 295-306.

**MARIN J. (1993).** Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. J. Auton. Pharmacol. 13: 127-176.

**MARKS A. R. (1992).** Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. Circulation 86 :III61-III67.

**MARTIN W.; VILLANI G. M.; JOTHIANANDAN D. y FURCHGOTT R. F. (1985).** Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 708-716.

**MASAKI T.; YANAGISAWA M. y KATSUTOSHI G. (1992).** Physiology and Pharmacology of endothelins. Medicinal Res. Rev. 4: 391-421.

**MASERO E. J.; ADELMAN R. C. y ROTH G. S. (1981).** Handbook of Physiology in ageing. Boca raton: CRC Press. pp: 76-155.

**MAYHAN W. G.; FARACI F. M.; BAUMBACH G. L. y HEISTAD D. D. (1990).** Effects of aging on responses of cerebral arterioles. Am. J. Physiol. 258: H1138-H1143.

**McCALDEN T. A. (1984).** Nimodipine and the cerebral circulation. Biblthca. Cardiol. 38: 244-299.

**McCARRON D. A. (1985).** Is calcium more important than sodium in the

pathogenesis of essential hypertension?. *Hypertension* 7: 607-627.

**McCARRON D. A. y MORRIS C. D. (1985).** Blood pressure response to oral calcium in persons with mild to moderate hypertension. *Ann. Inter. Med.* 103: 825-831.

**McCARRON D. A. y MORRIS C. D. (1986).** Metabolic considerations and cellular mechanism related to calcium's antihypertensive effects. *Fed. Proc.* 45: 2734-2738.

**McCARTHY R. T. y TANPIENGCO P. E. (1992).** Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high-affinity block of neuronal L-type by nimodipine. *J. Neurosci.* 12: 2225-2234.

**McCARRON D.; YUNG N; UGORETZ B. A. y KRUTZIK S. (1981).** Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat: attenuation of hypertension by calcium supplementation. *Hypertension* 3: 1162-1167.

**McCUMBEE W. D. y WRIGTH G. L. (1985).** Partial purification of hypertensive substance from rat erythrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63: 1321-1326.

**McCUMBEE W. D. JOHNSON P.; KASVINSKY P. J. y WRIGTH G. L. (1987).** An endogenous peptide that stimulates lanthanum-resistant calcium uptake in vascular tissue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 1991-1995.

**McPHERSON P. S.; KIM Y. K.; VALDIVIA H.; KNUDSON C. M.; TAKEKURA H.; FRANZINI-ARMSTRONG C.; CORONADO R. y CAMPBELL K. P. (1991).** The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7: 17-25.

**MEANS A. T.; VANBERKUM F. A.; BAGCHI I.; LU K. P. y RASMUSSEN C. D. (1991).** Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol. Ther.* 50: 255-270.

**MECCA T. E. y LOVE S. D. (1992).** Comparative cardiovascular actions of clentiazem, diltiazem, verapamil, nifedipine and nimodipine in isolated rabbit tissues. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20: 678-682.

**MEISHERI K. D.; HWANG O. y VAN BREEMEN C. (1981).** Evidenced for two separate  $\text{Ca}^{2+}$  pathways in smooth muscle plasmalemma. *J. Membran. Biol.* 59: 19-25.

**MEISSNER G. (1986).** Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261: 6300-6306.

**MERKE J.; HOFFMANN W.; GOLDSCHMIDT D. y RITZ E. (1987).** Demonstration of 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in vascular smooth cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 41: 112-114.

**MICHEL M. C.; BRODDE O. E. y INSEL P. A. (1990).** Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension* 16: 107-120.

**MIKHOSHIBA K. (1993).** Inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 86-89.

**MIKKELSEN E. O.; COSTA G. y NYBORG C. B. (1988).** Influence of endothelium on the response to calcium agonists, calcium, potassium, and noradrenaline in rat aorta. *Pharmacol. Toxicol.* 62: 22-28.

**MILA B.; TURLA y WEBB R. B. (1990).** Augmented phosphoinositide metabolism in aortas from genetically hipertensive rats. *Am. J. Physiol.* 258: H173 - H178.

**MILLER R. J. y FREEDMAN S. B. (1984).** Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels?. *Life Sci.* 34: 1205-1221.

**MILLER R. C. y STOCLET J. C. (1985).** Modulation by endothelium of contractile responses in rat aorta in absence and presence of flunarizine. *Br. J. Pharmacol.* 86: 655-661.

**MILLER V. M. y VANHOUTTE P. M. (1985).** Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am. J. Physiol.* 248: H432-H437.

**MINTZ I. M.; VENMA V. J.; SWIDEREK K.; LLE T.; BEAN B. P. y ADAMS M. E. (1992).** P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -AgaIVA. *Nature* 355: 827-829.

**MISSIAEN L.; DE SMEDT H.; DROOGMANS G.; HIMPENS B. y CASTEELS R. (1992).** Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* 56: 191-231.

**MOGUL D. J. y FOX A. P. (1991).** Evidence for multiple types of Ca<sup>2+</sup> channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurons of the guinea pig. *J. Physiol.* 433: 259-281.

**MONCADA S. y VANE J. R. (1978).** Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins, endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30: 293-331.

**MONCADA S.; PALMER R. M. J. y HIGGS E. A. (1988).** The discovery of nitric oxide and the endogenous nitrovasodilatador. *Hypertension* 12: 365-372.

**MOOLENAAR W. H.; YARDEN Y.; DE LAAT S. W. y SCHLESSINGER J. (1982).** Epidermal growth factor induces electrically silent Na<sup>+</sup> influx in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 257: 8502-8506.

**MOORE P. J.; AL-SWAYEH O. A.; CHONG N. W. S.; EVANS R. A. y GIBSON A. (1990).** L-N<sup>G</sup>-nitroarginine (NOARG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". *Br. J. Pharmacol.* 99: 408-412.

**MOREL N. y GODFRAIND T. (1988).** Selective modulation by membrane potential of the interaction of some calcium entry blockers with calcium channels in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 95: 252-258.

**MOREL N. y GODFRAIND T. (1991).** Characterization in rat aorta of the binding sites responsible for blockade of noradrenaline-evoked calcium entry by nisoldipine. *Br. J. Pharmacol.* 102: 467-477.

**MORGAN J. P. y MORGAN K. B. (1984).** Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. *J. Physiol.* 351: 155-167.

**MORITOKI H.; MIYANO H.; TAKEUCHI S.; YAMAGUCHI M.; HISAYAMA T. y KONDOH W. (1993).** Endothelin-3-induce relaxation of rat thoracic aorta: a role for nitric oxide formation. *Br. J. Pharmacol.* 108: 1125-1130.

**MÜLLER-SHWEIMTZER E. (1983).** Tissue specific susceptibility of alpha-adrenoceptor mediated vasoconstriction to nifedipine. *Archiv. Pharmacol.* 324: 64-69.

**MULLINS M. M.; LEINMAN L. I.; RUSSEL P. T. y SRIVASTAVA L. S. (1982).** Plasma aldosterone concentrations in neonatal SHR. *Life Sci.* 31: 2751-2755.

**MULLINS J. J.; PETERS J. y GANTEN D. (1990).** Fulminant hypertension in trasgenic rats harbouring the mouse. *Nature* 344: 541-544.

**MULVANY M. J. (1983).** Do resistance vessel abnormalities contribute to the elevated blood pressure of spontaneously hypertensive rats?. A review of some of the evidence. *Blood Vessels* 20: 1-22.

**MULVANY M. J. y NYBORG N. (1980).** An increased calcium sensitivity of

mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. Br. J. Pharmacol. 71: 585-596.

**MUROHARA T.; YASUE H.; OHGUSHI M.; SAKAINO N. y JOUGASAKI M. (1990).** Aged related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. Cardio. Res. 25: 1002-1009.

**MURPHY K. M. M.; GOULD R. J.; LARGENT B. L. y SNYDER S. H. (1983).** A unitary mechanism of calcium antagonist drug action. Proc. Natl. Acad. Sci 80: 860-864.

**NAKAMURA T. y PREWITT R. L. (1991).** Effect of N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine on endothelium-dependent relaxation in arterioles of one kidney, one clip hypertensive rats. Hypertension 17: 875-880.

**NARITA H.; NAGAO T.; TABANA H. y YAMAGUCHI I. (1983).** Hypotensive and diuretic actions of diltiazem in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 227: 472-477.

**NAVARATNAM S. y KHATTER J. C. (1991).** Increased [<sup>3</sup>H] nitrendipine binding sites in rat heart during adult maturation and aging. Biochem. Pharmacol. 41: 593.

**NAVARATNAM S. y KHATTER J. C. (1990).** Increase in number of myocardial [<sup>3</sup>H] BAY K 8644 binding sites during adult maturation of rat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 68: 877.

**NAVRAN S. S.; ADAIR S. E.; JEMELKA S. K.; SEIDEL C. L. y ALLEN J. C. (1988).** Sodium pump stimulation by activation of two alpha adrenergic receptor subtypes in canine blood vessels. J. Pharmacol. Exp. Ther. 245: 608-613.

**NAYLER W. G. (1988).** Antagonistas del Ca. Ed. Springer- Verlag. Cap.11-17: 157-260.

**NELSON M. T.; STANDEN N. B.; BRAYDEN J. E. y WORLEY J. F. (1988).** Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. Nature 336: 382-385.

**NELSON M. T.; PATLAK J. F.; WORLEY J. F. y STANDEN N. B. (1990).** Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. Am.J. Physiol. 259: C3-C18.

**NEUSER D.; SCHULTE-BRINK M. R. y KAZDA S. (1991).** Influence of transplantation of parathyroid glands on blood pressure development in stroke phone

spontaneously hypertensive rats and in normotensive Wistar-Kyoto rats. Clin. Exp. Hypertension 13: 325-338.

**NEYLON C. B. y SUMMERS R. J. (1987).** Stimulation of  $\alpha_1$  adrenoceptors in rat kidney mediates increased inositol phospholipid hydrolysis. Br. J. Pharmacol. 91 : 367-376.

**NGHIEM C.; SWAMY V. C. y TRIGGLE D. J. (1982).** Inhibition by D 600 of norepinephrine and clonidine-induced responses of the aortae from normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Life Sci. 30: 45-49.

**NIELSEN H.; HASENKAM J. M.; PILEGAARD H. K.; AALKJAER C. y MORTENSEN F. V. (1992).** Age-dependent changes in  $\alpha$ -adrenoceptor-mediated contractility of isolated human resistance arteries. Am. J. Physiol. 263: H1190-H1196.

**NIELSEN K. C. y OWAN C. (1971).** Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. Brain Res. 27: 33-42.

**NISHIMURA J.; KHALIL R. A. y VAN BREEMEN C. (1989).** Agonist-induced vascular tone. Hypertension 13: 835-844.

**NISHIMURA K.; OTA M. y ITO K. (1991).** Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by alpha 1-adrenoceptor activation. Br. J. Pharmacol. 102: 215-221.

**NISHIZUKA Y. (1984).** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature 308: 693-698.

**NISHIZUKA Y. (1988).** The molecular heterogeneity of protein kinase C. Science 233: 305-312.

**NORBERG K. A. (1967).** Transmitter histochemistry of the sympathetic adrenergic nervous system. Brain Res. 5: 125-170.

**NORMAN R. A. J. R. y DZIELAK D. J. (1982).** Role of renal nerves in onset and maintenance of spontaneous hypertension. Am. J. Physiol. 243: H284- H288.

**NOWYCKY M. C.; FOX A. P. y TSIEN R. W. (1985).** Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonists sensitivity. Nature 316: 440-443.

**OBAID A. L.; KOMURO H.; KUMAR S. S.; SUGIMORI M. y LIN J. W. (1990).** FTX an HPLC-purified fraction of funnel web spider venom blocks calcium channels required for normal release in peptidergic nerve terminals of mammals:

optical measurements with and without voltage-sensitive dyes. *Biol. Bull.* 179: 232.

**OHLSTEIN E. H.; DRUSE L. I.; EXEKIEL M.; SHERMAN S. S.; ERICKSON R.; DE WOLF W. E. y BERKOWITZ B. A. (1987).** Cardiovascular effects of a new potent dopamine  $\beta$ -hydroxylase inhibitor in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 554-559.

**OHLSTEIN E. H.; HOROHONICH S. y HAY D. W. (1989).** Cellular mechanisms of endothelin in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 548-555.

**OKAMURA K. ; KONDO J.; SHIRAI Y.; MURAMATSU M.; YAMADA Y.; HASHIMOTO H. y ITO T. (1990).** 1,2-Diacylglycerol content in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 16: 43-48.

**ORIOWO M. A. y RUFFOLO R. R. J. R. (1992).** Activation of a single alpha-1-adrenoceptor subtype in rat aorta mobilizes intracellular and extracellular pools of calcium. *Pharmacology* 44: 139-149.

**OSHIMA T.; YOUNG E. W.; BUBOSKI R. D.; y McCARRON D. A. (1990).** Abnormal calcium handling by platelets of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 15: 607-611.

**OSHIMA T.; MATSURA H.; KIDO K.; MATSUMOTO K.; FUJII H.; MASAOKA S.; OKAMOTO M.; TSUCHIOKA Y.; KAJIYAMA G. y TSUBOKURA T. (1988).** Intralymphocytic sodium and free calcium and plasma renin in essential hypertension. *Hypertension* 12: 26-31.

**OSUGI S.; SHIMAMURA K. y SUNANO S. (1990).** Decreased modulation by endothelium of noradrenaline-induced contractions in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 305: 86-99.

**OTSUKA Y.; DIPIERO A.; HIRT E.; BRENNAMAN B. y LOCKETTE W. (1988).** Vascular relaxation and cGMP in hypertension. *Am. J. Physiol.* 254: H163-H169.

**OWEN T. L. (1985).** Reactivity of small vessels from mature to senescent female rabbits. *Blood Vessels* 24: 113-116.

**PACAUD P.; LOIRAND G.; BARON A.; MIRONNEAU CH. y MIRONNEAU J. (1991).**  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation and membrane depolarization mediated by  $\text{Cl}^-$  channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 104: 1000-1006.

**PALMER R. M. J.; ASHTON D. S. y MONCADA S. (1988).** Vascular

endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 33: 664-666.

**PANDITA-GUNAWARDENA N. D.; DORRANCE D. E. y McDONALD G. (1989).** Efficacy of nitrendipine in the treatment of elderly hypertensive subjects, and its effect on cerebral blood flow. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14: S52-S58.

**PANG P. K. T; BENISHIN C. G. y LEWANCZUK R. Z. (1992).** Combined effect of dietary calcium and calcium antagonists on blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 19: 442-446.

**PANG P. K. T.; KANERO T. y LEWANCZUK R. Z. (1990).** Parathyroid origin of a new hypertensive factor. *Exp. Gerontol.* 25: 267-277.

**PANG C. C. Y. y SUTTER M. C. (1981a).** Differential effects of D 600 on contractile response of aorta and portal vein from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 18: 120-127.

**PANZA J. A.; QUYUMI A. A.; BRUSH J. E. y EPSTEIN S. E. (1990).** Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl. J. Med.* 323: 22-27.

**PARRIER G. S. y HOLKIN NEAVERSON M. (1984).** Phosphatidylinositol synthase from canine pancreas: solubilization by n-octyl glucopyranoside and stabilization by manganese. *Biochemistry* 23: 4785-4791.

**PATO M. D. y ADELSTEIN R. S. (1980).** Dephosphorylation of the 20000 dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 255: 6535-6538.

**PEIRO C.; DE SAGARRA M. R.; REDONDO J.; SANCHEZ-FERRER C.F. y MARIN J. (1992).** Vascular smooth muscle proliferation in hypertensive transgenic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20: S128-S131.

**PELZER D.; PELZER S. y McDONALD T. F. (1990).** Properties and regulation of calcium channels in muscle cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 114: 108-148.

**PERNOT F.; SCHLEIFFER R.; VINCENT M.; SASSARD J. y GAIRARD A. (1990).** Parathyroidectomy in the Lyon hypertensive rat: cardiovascular reactivity and aortic responsiveness. *J. Hypertension* 8: 1111-1117.

**PHILIPP T. H.; DISTLER A. y CORDES U. (1978).** Sympathetic nervous system and blood pressure control in essential hypertension. *Lancet*. II. 959-963.



**PÖRSTI I. (1992).** Arterial smooth muscle contractions in spontaneously hypertensive rats on a high calcium diet. *J. Hypertension* 10: 255-263.

**POSTNOV Y. V.; KRAVTSOV G. M.; ORLOV S. N.; POKUDIN N. I.; POSTNOV I. Y. y KOTELEVTSYEV Y. V. (1988).** Effect of protein kinase C activation on cytoskeleton and cation transport in human erythrocytes. *Hypertension* 12: 267-273.

**POSTNOV Y. V.; ORLOV S. N.; RJAZHSKY G. G. y PODUKIN N. I. (1979).** Decrease of calcium binding by the red blood cell membrane in spontaneously hypertensive rats and in essential hypertension. *Pflügers Arch.* 379: 191-195.

**POURAGEAUD F. y FRESLON J. L. (1992).** Endothelium function in resistance and coronary arteries of spontaneously hypertensive compared to WKY rats: effects of nitro-L-arginine. *Genetic Hypertension* 218: 39-41.

**POUYSESEGUR J.; CHAMBARD J. C.; FRANCHI A.; PARIS S. y VAN OBBERRGHEN-SCHILLING E. (1982).** Growth factor activation of an amiloride sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange system in quiescent fibroblasts: coupling to ribosomal protein S6 phosphorylation. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 79: 3935-3939.

**RAEYMAEKERS L.; EGGERMONT J. A.; WUYTACK T. y CASTEELS R. (1990).** Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump of bovine pulmonary artery. *Cell Calcium*. 11: 261-268.

**RAEYMAEKERS L. y WUYTACK F. (1993).**  $\text{Ca}^{2+}$  pumps in smooth muscle cells. *J. Muscle Res. and Cell Motility* 14: 141-157.

**RAPOPORT R. M. y MURAD F. (1983).** Effects of ouabain and alterations in potassium concentration on relaxation induced by sodium nitropruside. *Blood Vessels* 20: 255-264.

**RASMUSSEN H. (1986).** The calcium messenger system. First part. *New Engl. J. Med.* 314: 1094-1101.

**RASMUSSEN H.; FORDER J.; JOKIMA I. y SCHARIBINE E. (1984).** TPA-induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 776-784.

**RAU L. M. D. (1991).** Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors. *Am. J. Med.* 90: 2A-13S.

**REES R. D.; PALMER R. M. J.; SCHELZ H. F.; HODSON H. F. y MONCADA S. (1990).** Characterization of three inhibitors of endothelial nitric

oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J. Pharmacol. 101: 746-52.

**REGEHR W. G.; CONNOR J. A. y TANK D. W. (1989).** Optical imaging of calcium accumulation in hippocampal pyramidal cells during synaptic activation. Nature 341: 533-536.

**REMBOLD C. R. (1992).** Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. Hypertension 20: 129-137.

**RESNICK L. M. (1990).** Calcitropic hormones in human and experimental hypertension. Am. J. Hypertension 3: S171-S178.

**RESNICK L. M.; MÜLLER F. B. y LARAGH J. H. (1986).** Calcium regulating hormones in essential hypertension relation to plasma renin activity and sodium metabolism. Ann. Intern. Med. 105: 649-654.

**RICO I.; ALONSO M. J.; SALAICES M. y MARIN J. (1990).** Pharmacological dissection of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the rat aorta by  $\text{Ca}^{2+}$  entry modulators. Pharmacology 40: 330-342.

**RODENKIRCHEN R.; BAYER R. y MANNHOLD R. (1982).** II specific and nonspecific Ca antagonists. A structure-activity analysis of cardiodepressive drugs. Prog. Pharmacol. 5: 9-23.

**ROSENBERGER L. B. y TRIGGLE D. J. (1978).** Calcium translocation and specific calcium antagonists. En: Calcium and drug action. Ed. Weiss G B. Plenum publishing Co. New York. pp: 3-31.

**ROUSE D. y SUKI W. N. (1990).** Renal control of extracellular calcium. Kidney Int. 38: 700-708.

**RUBANYI G. M. (1988a).** Endothelium-derived vasoconstrictor factors. En: Endothelial cell. Ed. Ryan U. S. CRC Press. Boca Ratón. Fla. Vol. III pp: 61-70.

**RUBANYI G. M. ; HOEFFNER U.; SCHWARTZ A. y VANHOUTTE P. M. (1988b).** Stereoselective effect of diltiazem on endothelium-dependent relaxations in canine femoral arteries. J. Pharmacol. Exp. Ther. 246: 60-64.

**RUBANYI G. M. SCHWATZ A. y VANHOUTTE P. M. (1985).** Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. J. Physiol. 364-345.

**RUCH S.; KENNEDY R. H. y SEIFEN E. (1992).** Aging: ionotropic effects of Bay K 8644 and nifedipine on rat cardiac muscle. Eur. J. Pharmacol. 216: 393-400.

**RUFF R. L. (1986).** Ionic channels: II voltage and agonists gated and agonists modified channel properties and structure. *Muscle Nerve* 9: 767-786.

**RUSCH N. J. y HERMSMEYER K. (1988).** Calcium currents are altered in the vascular muscle cell membrane of spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 63: 997-1002.

**SAFAR M. (1990).** Ageing and its effects on the cardiovascular system. *Drugs* 39: 1-8.

**SAIDA K. (1982).** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release in skinned smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 80: 191-202.

**SAIDA K. y VAN BREEMEN C. (1983).** Inhibiting effect of diltiazem on intracellular calcium release in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 20: 105-108.

**SAIDA K. y VAN BREEMEN C. (1984).** Characteristics of the norepinephrine sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 21: 43-52.

**SAITO K.; SANO H.; FURUTA Y. y FUKUZAKI H. (1989).** Effect of oral calcium on blood pressure response in salt-loaded borderline hypertensive patients. *Hypertension* 13: 219-226.

**SAKAI M.; DANZIGER R. S.; XIAO R. P.; SPURGEON H. A. y LAKATTA E. G. (1992).** Contractile response of individual cardiac myocytes to norepinephrine declines with senescence. *Am. J. Physiol.* 262: H184-H189.

**SALAICES M.; ALONSO M. J.; RICO I.; FERNANDEZ-ALFONSO M. S. y MARIN J. (1989).** Vasoconstrictor effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  agonist bay K 8644 on human cerebral arteries. *Brain Res.* 490: 133-140.

**SALAICES M.; BALFAGON G.; ARRIBAS S.; SAGARRA M. R. y MARIN J. (1990).** Effect of phorbol 12,13 dibutyrate on the vascular tone and on norepinephrine and potassium-induced contractions of cat cerebral arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 66-73.

**SALAICES M.; MARIN J.; SANCHEZ-FERRER C. F. y REVIRIEGO J. (1985).** The effects of BAY K 8644 on the contraction of cat middle cerebral and femoral arteries. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3131-3135.

**SAMATA K.; KIMURA T.; SATOH S. y WATANABE H. (1986).** Chemical removal of the endothelium by saponin in isolated dog femoral artery. *Eur. J. Pharmacol.* 128: 85-91.

**SANCHEZ-FERRER C. F. y MARIN J. (1990).** Endothelium-derived contractile factors. *Gen. Pharmacol.* 21: 589-603.

**SARMIENTO J. G.; JANIS R. A.; KATS A. M. y TRIGGLE D. J. (1984).** Comparison of high affinity binding of calcium channel blocking drugs to vascular smooth muscle and cardiac sarcolemmal membranes. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3119-3123 .

**SCHEDL H. P.; WILSON H. D. y HORST R. L. (1988).** Calcium transport and vitamin D in three beeds of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 12: 310-316.

**SCHLEIFFER R.; GHYSEL-BURTON J.; FINET M. y GAIRARD A. (1991).** Effect of parathyroidectomy on development of hypertension and atrial responsiveness in spontaneously hipertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 18: 145-154.

**SCHRAMM M.; BECHEM M.; FRANCKOWIAK G.; THOMAS G. y TOWART R. (1986).** Calcium antagonist and calcium agonist drugs. *Ion channels in neuronal membranes*: 213-225.

**SCHRAMM M.; THOMAS G.; TOWART R. y FRANCKOWIAK G. (1983).** Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nature* 303: 535-557.

**SCHWARTZ A. y ADAMS R. J. (1980).** Studies of the digitalis receptor. *Circ. Res.* 46: 154-160.

**SCHREIBMAYER W.; TRIPATHI O. y TRITTHART H. A. (1992).** Kinetic modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium channels by fendiline and reversal of the effects of Bay K 8644. *Br. J. Pharmacol.* 106: 151-156.

**SCHULMAN H. y HANSON P. I. (1993).** Multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *Neurochem. Res.* 18: 65-77.

**SCHULTZ G.; ROSENTHAL y HESCHELER H. (1990).** Role of G protein in calcium channel modulation. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 275-292.

**SCHÜSSLER B.; VÖLKER W.; RAHN K. H. y ZIDEK W. (1992).** Cytoplasmic free calcium concentration in isolated vascular smooth muscle cells from spontaneous hypertensive rats. *En: Genetic hypertension.* 218: 565-567.

**SCOTT-BURDEN T.; RESINK T. J. y BÜHLER F. R. (1989).** Enhanced growth and growth factor responsiveness of vascular smooth muscle cells from hypertensive

rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14: S16-S21.

**SCRIABINE A.; HOHNSON C. E.; ANERSON C. L.; STEINSLAND O. S. y JANIS R. A. (1984).**  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitory effects of nitrendipine on isolated rabbit arteries. En: *Nitrendipine*. Eds. Scriabine A.; Vanov S. y Dock K. Urban & Schwarzenberg. Baltimore. pp: 281-292.

**SCRIABINE A. y KAZDA S. (1989).** Pharmacological basis for use of calcium antagonists in hypertension. *Magnesium* 8: 253-265.

**SHARMA R. V. y BHALLA R. C. (1988).** Calcium and abnormal reactivity of vascular smooth muscle in hypertension. *Cell Calcium* 9: 267-274.

**SHEPHERD J. T. (1990).** Increased systemic vascular resistance and primary hypertensive the expanding complexity. *J. Hypertension* 8: S15-S27.

**SHIBATA H. y GHISHAN F. K. (1991).** Intestinal brush border calcium uptake in spontaneously hypertensive rats and their genetically matched WKY rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196: 54-60.

**SHICHIRI M.; HIRATA Y.; ANDO K.; EMORI T.; OHTA K.; KIMOTO S.; OGURA M.; INOUE A. y MARUMO F. (1990).** Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* 15: 493-496.

**SHIFFMAN F. H. y BOSE R. (1988).** A role of calcium in altered sodium ion transport of hypertensives?. *Life Sci.* 42: 1573-1581.

**SHIKANO K.; OHLSTEIN E. H. y BERKOWITZ B. A. (1987).** Differential selectivity of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide in smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* 92: 483-485.

**SHIMAMURA K.; OSUGI S.; MORIYAMA K. y SUNANO S. (1991).** Impairment and protection of endothelium-dependent relaxation in aortae of various strains of spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17: S133-S136.

**SHIMIZU I. y TODA N. (1986).** Alterations with age of the response to vasodilator agents in isolated mesenteric arteries of the beagle. *Br. J. Pharmacol.* 89: 769-778.

**SHIRAHASE H.; FUJIWARA M.; USUI H. y KURAHASHI K. (1987).** A possible role of thromboxane  $\text{A}_2$  in endothelium in maintaining resting tone and producing contracile response to acetylcholine and arachidonic acid in canine cerebral arteries. *Blood Vessels* 24: 117-119.

- SHIRAHASE H.; USUI H.; MANABA K.; KURAHASHI K. y FUJIWARA M. (1988a).** Endothelium-dependent contraction and independent relaxation induced by adenine nucleotides and nucleoside in the canine basilar artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 1152-1157.
- SHIRAHASE H.; USUI H.; MANABA K.; KURAHASHI K. y FUJIWARA M. (1988b).** An endothelium-dependent contraction induced by A-23187, a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore in canine basilar artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 701-705.
- SHIRASAKI Y.; KOLM P.; NICKOLS G. A. y LEE T J.-F. (1988).** Endothelial regulation of cyclic GMP and vascular responses in hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 53-58.
- SHOENBERGZ C. F. y HASELGROVE J. C. (1974).** Filaments and ribbons in vertebrate smooth muscle. *Nature* 249: 152-154.
- SILVER P. J. (1986).** Pharmacological modulation of cardiac and vascular contractile protein function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: S34-S46.
- SIMARD J. M. (1991).** Calcium channel currents in isolated smooth muscle cells from the basilar artery of the guinea-pig. *Pflügers Arch.* 417: 528-536.
- SIMS S. M. (1992).** Calcium and potassium currents in canine gastric smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 262 : G859-G867.
- SING C. F.; BOERWINKLE E . y TURNER S. T. (1986).** Genetics of primary hypertension. *Clin. Exp. Hypertension* A8: 623-651.
- SINGER H. A.; PEACH M. H. (1982).** Calcium-and endothelial mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 4: II 19-II 25.
- SKATTEBOL A.; BROWN A. M. y TRIGGLE D. J. (1989).** Homologous regulation of voltage-dependent calcium channels by 1,4-dihydropyridines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 : 929-936.
- SMIRNOV S. V.; ZHOLOS A. V. y SHUBA M. F. (1992).** Potential-dependent inward currents in single isolated smooth muscle cells of the rat ileum. *J. Physiol.* 454: 549-571.
- SMITH W. M. (1988).** Epidemiology of hypertension in older patients. *Am. J. Med.* 38: 2-6.
- SOMLYO A. P. (1980).** Ultrastructure of vascular smooth muscle. En: *The handbook of physiology. The cardiovascular system, vol II, vascular smooth muscle.*

Eds: Bohr D. F.; Somlyo A. P. y Sparks H. V. Washington D. C. Am. Physiol. Soc. pp: 33-67.

**SOMLYO A. P. (1985).** Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ. Res.* 57: 497-508.

**SOMLYO A. P.; BRODERICK R.; SOMLYO A. V. (1986).** Calcium and sodium in vascular smooth muscle. *Ann. NY Acad. Sci.* 488: 228-239.

**SOMLYO A. P.; DEVINE C. E.; SOMLYO A. V. y NORTH S. R. (1971).** Sarcoplasmic reticulum and the temperature-dependent contraction of smooth muscle in calcium-free solutions. *J. Cell. Biol.* 51: 722-741.

**SORRENTINO V. y VOLPE P. (1993).** Ryanodine receptors: How many, where and why?. *Trends. Pharmacol. Sci.* 14: 98-103.

**SPEEDING M. (1985).** Calcium antagonists subgroups. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 109-114.

**SPEEDING M. (1987).** Interaction of phorbol esters with  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 91: 377-384.

**SPEEDING M. y BERG C. (1984).** Interactions between a "calcium channel agonists" Bay K 8644, and calcium antagonists differentiate calcium antagonists subgroups in  $\text{K}^{+}$ -depolarized smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 328: 69-75.

**SPEEDING M.; FRASER S.; CLARKE B.; PATMORE L. (1990).** Factors modifying the tissue selectivity of calcium-antagonists. *J. Neural. Transm.* 31: 5-16.

**SPEEDING M. y PAOLETTI R. (1992).** Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.* 44: 363-376.

**SPEEDING M.; SCHINI P.; SHOEFFTER Y MILLER R. C. (1986).** Calcium channel activation does not increase release of endothelial-derived relaxant factors (EDRF) in rat aorta although tonic release of EDRF may modulate calcium channel activity in smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: 1130.

**STANFIELD P. R. (1986).** Voltage-dependent calcium channels of excitable membranes. *Br. Med. Bull.* 42: 359-367.

**STASCH J. P. y KAZDA S. (1989).** Endothelin-1-induce vascular contractions: interactions with drugs affecting the calcium channel. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5:

S63-S66.

**STEEN P. A.; NEWBERG L. A. y MILDE H. J. (1983).** Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischaemia in the dog. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3: 38-43.

**STERN N.; LEE D. B. N.; SILIS V.; BECK F. W. J.; DEFTOS L.; MANOLAGAS S. C. y SOWERS J. R. (1984).** Effects of high calcium intake on blood pressure and calcium metabolism in young SHR. *Hypertension* 6: 639-646.

**STOREY D. J.; SHEARS S. B.; KIRK C. J. y MICHELL R. A. (1984).** Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate to inositol in liver. *Nature* 312: 374-376.

**STORM D. S.; STUENKEL E. L. y WEBB R. C. (1992).** Calcium channel activation in arterioles from genetically hypertensive rats. *Hypertension* 20: 380-388.

**STORM D. S.; TURLA M. B.; TODD K. M y WEBB R. C. (1990).** Calcium and contractile responses to phorbol esters and calcium channel agonist, Bay K 8644, in arteries from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertension* 3: 245S- 248S.

**STRÜBING C.; HERING S. y GLOSSMANN H. (1993).** Evidence for an external location of the dihydropyridine agonist receptor site on smooth muscle and skeletal muscle calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* 108: 884-891.

**STULL J. T.; BLUMENTHAL D. K.; MILLER J. R. y DISALVO J. (1982).** Regulation of myosin phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiovasc.* 14: 105-110.

**STUREK M. y HERMSMEYER K. (1986).** Calcium and sodium channels in spontaneously contracting vascular muscle cells. *Science* 233: 475-478.

**SU C. M.; SWAMY V. C. y TRIGGLE D. J. (1984).** Calcium channel activation in vascular smooth muscle by Bay K 8644. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62: 1401-1410.

**SUDHOF T. C.; NEWTON C. L.; ARCHER B. T.; USHKARYOV A. y MIGNERY-GA. (1991).** Structure of a novel InsP3 receptor. *EMBO-J.* 10: 3199-206.

**SUGIYAMA T.; YOSHIZUHI M.; TAKAKU F. y YAZAKI Y. (1990).** Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 8: 369-375.

**SULLIVAN J. M. y LASATER E. M. (1990).** Funnel-webb spider toxin (FTX)



selectively blocks the sustained, but not the transient calcium current in retinal horizontal cells. Soc. Neurosci. Abstr. 16: 157.

**SUZUKI N.; MIYAUCHI T.; TOMOBE Y.; MATSUMOTO H.; GOTO K.; MASAKI T. y FUJINO M. (1990).** Plasma concentrations of endothelin-1 in spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt hypertensive rats. Biochem. Biophys. Res. Comm. 167: 941-947.

**TAKASHASHI M. y CATTERALL W. A. (1987a).** Identification of an  $\alpha$  subunit of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels. Science 236: 88-91.

**TAKASHASHI M. y CATTERALL W. A. (1987b).** Dihydropyridine-sensitive calcium channels in cardiac and skeletal membranes: studies with antibodies against the  $\alpha$  subunit. Biochemistry 26: 5518-5526.

**TAKATA Y. y HUTCHINSON J. S. (1983).** Exaggerated hypotensive responses to calcium antagonists in spontaneously hypertensive rats. Clin. Exp. Hypertension A5: 827-847.

**TAKATA Y.; OZAWA J. y KATO H. (1992).** Possible involvement of both N and L-type voltage-dependent Ca channels in adrenergic neurotransmission of canine saphenous veins in low  $\text{Ca}^{2+}$  plus tetraethylammonium medium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 346: 419-424.

**TAKAYANAGI I.; SHINKAI M. y YAMASAWA K. (1989).** Effects of aging on  $\alpha_1$ -adrenoceptor mechanisms and the inhibitory effect of diltiazem on noradrenaline maximum response in isolated rat aortic preparation. Can. J. Physiol. Pharmacol. 67: 1398-1402.

**TAKENAKA T. y HANDA J. (1979).** Cerebrovascular effects of YC93, a new vasodilator in dogs, monkeys and human patients. Int. Clin. Pharmac. Biopharm. 17: 1-11.

**TAKENAKA T. y MAENO H. (1982).** A new vasoconstrictor 1,4-dihydropyridine derivated, YC-170. Jpn. J. Pharmacol. 32: 139.

**TAMARGO J. DELPÓN E. (1992).** Antagonistas del Ca. En: Farmacología humana. Eds: Florez J. Masson. Salvat. Barcelona. pp: 555-564.

**TANABE T.; TAKESHIMA H.; MIKAMI A.; FLOCKERZI V.; TAKAHASHI H.; KANGAWA K.; KOJIMA M.; MATSUO H.; HIROSE T. y NUMA S. (1987).** Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. Nature 328: 313-318.

- TANG C. M. y MORAD M. (1988).** Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Biophys. J.* 53: 22a.
- TANK D. W.; SUGIMORI M.; CONNOR J. A. y LLINAS R. R. (1988).** Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slices. *Science* 242: 773-777.
- TANOI C.; SUZUKI Y.; SHIBUYA M.; SUGITA K. y MASUZAWA I. K.; ASANO M. (1992).** Comparison of vasoconstrictor actions of endothelin-1 in cerebral, coronary, and mesenteric arteries of the dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 19: 568-579.
- TESFAMARIAN B. y HALPERN W. (1988).** Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension* 11: 440-444.
- THIND G. S. (1990).** Angiotensin converting enzyme inhibitors: comparative structure, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 4: 199-206.
- TIMMERMANS P. B. M. W. M.; BECKENRINGH J. J.; VAN ZWIETEN P A. y THOOLEN M. J. M. C. (1987).** Sensitivity of alpha-adrenoceptor-mediated pressor responses to inhibition by  $Ca^{2+}$  entry blockers in the pithed rat; arguments against the role of receptor reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 864.
- TODA N. (1991).** Age-related changes in responses to nerve stimulation and catecholamines in isolated monkey cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 260: H1443-H1448.
- TODA N.; BIAN K. y INOUE S. (1987).** Age-related changes in the response to vasoconstrictor and dilator agents in isolated beagle coronary arteries. *Arch. Pharmacol.* 336: 359-364.
- TODA N. y HAYASHI T. (1989).** Age-dependent alteration in the response of isolated rabbit basilar arteries to vasoactive agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 716-721.
- TODA N.; OKAMURA T. y MIYAZAKI M. (1986).** Age-dependent changes in the response of isolated beagle coronary arteries to transmural electrical stimulation and catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 319-326.
- TOKUSHIGE A.; KINO M.; TAMURA H.; HOPP L.; SEARLE B. M. y AVIV A. (1986).** Bumetanide-sensitive sodium-22 transport in vascular smooth muscle cell of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8: 379-385.

**TORO L. y STEFANI E. (1987).**  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  current in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Pflugers Arch.* 408: 417-419.

**TRIGGLE D. J. y JANIS R. A. (1989).** Recent development in calcium channel antagonists. *Magnesium* 8: 213-22.

**TRIPATHI O.; SCHREIBMAYER W. y TRITTHART O. (1992).** A novel site of action on L-type calcium channels as evident from the effects of fendiline, a diphenylalkylamine agent, on guinea pig ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24: S136.

**TRIPATHI O.; SCHREIBMAYER W. y TRITTHART H. A. (1993).** Fendiline inhibits L-type calcium channels in guinea-pig ventricular myocytes: a whole-cell patch-clamp study. *Br. J. Pharmacol.* 108: 865-869.

**TRUOG A. G.; BRUNNER H.; CRISCIONE L.; FALLERT M.; KUHNIS H. y ROG G. (1985).** GCP 28392 a dihidropiridine  $\text{Ca}^{2+}$  entry stimulator. En: *Calcium in Biological System*. Eds: Rubin R P.; Weiss G B. y Putney J W J Jr. Plenum Press. New York.pp: 441-449

**TSUJIMOTO G.; LEE C. H. y HOFFMAN B. B. (1986).** Age-related decrease in beta adrenergic receptor-mediated vascular smooth muscle relaxation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239: 411-415.

**TURLA M. B. y WEBB R. C. (1990).** Augmented phosphoinositide metabolism in aortas from genetically hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*: H173-H174.

**TURLAPATY P. D. M. V.; ALTURA B. T. y ALTURA B. M. (1979).** Ethanol reduces  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in arterial and venous smooth muscle. *Experientia* 35: 639-640.

**TWIETMEYER T. A.; BHALLA R. C. y MAYNARD H. A. (1978).** Acid and alkaline phosphatase activities and calcium transport in aortic smooth muscle from DOCA hypertensive rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 1131-1140.

**UEHARA Y.; ISHII M.; ISHIMITSU T. y SUGIMOTO T. (1988).** Enhanced phospholipase C activity in the vascular wall of spontaneously y hypertensive rats. *Hypertension* 11: 23-33.

**UNGER y GOHLKE P. (1990).** Tissue renin-angiotensin systems in the heart and vasculature: possible involvement in the vascular actions of converting enzyme inhibitors. *Am. J. Cardiol.* 65: 31-101.

**VAGHY P. L.; WILLIAMS J. S. y SCHWARTZ A. (1987).** Receptor

pharmacology of calcium entry blocking agents. *Am. J. Cardiol.* 59: 9-17.

**VAN DE VOORDE J. y LEUSEN I. (1986).** Endothelium dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 250: H711 -H717.

**VAN DE VOORDE J.; VANHEEL B. y LEUSEN I. (1988).** Depressed endothelium-dependent relaxation in hypertension: relaxation to increased blood pressure and reversibility. *Eur. J. Physiol.* 411 : 500-504.

**VAN BREEMEN C.; FARINAS B. R.; GERABA P.; y McNAUGHTON E. D. (1972).** Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx. *Cir. Res.* 30: 44-54.

**VAN BREEMEN C.; CAUVIN C.; YAMAMOTO H. y ZSCHAUER A. (1987).** Vascular smooth muscle calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10: S 10-S 15.

**VAN MEEL J. C. A.; DE JONGE A. y KALKMAN H. O. (1981).** Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316: 288-289.

**VAN ZWIETEN P. A. (1989).** Vascular effects of calcium antagonists: implications for hypertension and other risk factors for coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 64 : 1171-1211.

**VANE J. (1990).** Endothelins come home to roost. *Nature* 348: 673-675.

**VANHOUTTE P. M. (1986).** Vascular endothelium and  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12: S21-S28.

**VANHOUTTE P. M. (1987).** Endothelium-dependent contractions in arteries and veins. *Blood Vessels* 24: 131-144.

**VANHOUTTE P. M. (1988).** Endothelium and the control of vascular smooth muscle. En: *Cerebral Vasospasm*. Eds: Wilkins R. H. Raven Press. New York. pp: 119-128.

**VANHOUTTE P. M. y HOUSTON D. S. (1985).** Platelets, endothelium and vasospasm. *Circulation* 72: 728-734.

**VANHOUTTE P. M.; LÜSCHER T. F. y GRÄSER T. (1991).** Endothelium-dependent contractions. *Blood Vessels* 28: 74-83.

- VASSALLE M. (1987).** Contribution of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - pump to the membrane potential. *Experientia* 43: 1135-1140.
- VIZENCI F. F.; MORRIS C. D.; KINSEL L. B.; KENNY M. y McCARRON D. A. (1986).** Decreased calcium pump adenosine triphosphatase in red blood cells of hypertensive subjects. *Hypertension* 8: 1058-1066.
- VOKONAS P. S.; KANNEL W. B.; LCUPPLES L. A. (1988).** Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham study. *J. Hypertension* 6: S3-S9.
- WADSWORTH R. M. (1990).** Calcium and vascular reactivity in ageing and hypertension. *J. Hypertension* 8: 975-983.
- WALTERS M. R.; WICKER D. C. y RIGGLRE P. C. (1986).** 1,25 Dihydroxy-vitamin D3 receptors identified in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18 : 67-72.
- WANSTALL J. C. y O'DONNELL S. R. (1988).** Inhibition of norepinephrine contractions by diltiazem on aorta and pulmonary artery from young and aged rats: influence of alpha-adrenoceptor reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 1016.
- WANSTALL J. C. y O'DONNELL (1989).** Ages influences responses of rat isolated aorta and pulmonary artery to the calcium channel agonist, Bay K 8644, and to potassium and calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13: 709-714.
- WATANABE T.; ITOH Y.; OGI K.; KIMURA C.; SUZUKI N. y ONDA H. (1989).** Synthesis of human endothelin-1 precursors in Escherichia coli. *FEBS Lett.* 251: 257-260.
- WEBB R. C. y BHALLA R. C. (1976).** Altered calcium sequestration by subcellular fractions of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 8: 651-656.
- WEI J. Y. (1989).** Use of calcium entry blockers in elderly patients. *Circulation* 80: IV 171-IV 177.
- WEISSINGER J. (1984).** Propanolol can inhibit the development of hypertension in SHR. *Clin. Exp. Hypertension* A6: 1169-1177.
- WELLAM W. E. y EDWARDS J. E. (1950).** Thickness of the media of the thoracic aorta in relation to age. *Arch. Pathol.* 50: 183-188.
- WENGER N. K. (1988).** Cardiovasculr disease in the elderly. *Ciba Found Symp.* 134: 106-128.

- WESTENBROEK R. E.; AHLIJANIAN M. K. y CATTERALL W. A. (1990).** Clustering of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 347: 281-284.
- WESTFALL T. C.; MELDRUM M. J.; BADINO L. y EANHARDT J. T. (1984).** Noradrenergic transmission in the isolated portal vein of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 6: 267-274.
- WIBO M.; DeROTH L. y GODFRAIND T. (1988).** Pharmacologic relevance of dihydropyridine binding sites in membranes from rat aorta: Kinetic and equilibrium studies. *Circ. Res.* 62: 91-96.
- WILLIAMS J. S.; BAIK Y H.; KOCH W. J. y SCHWARTZ A. (1987).** A possible role for the endothelium in porcine coronary smooth muscle responses to dihydropyridine calcium channel modulators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 379-386.
- WINKLER M. A.; DEWITT L. M.; y CHEUNG W. Y. (1987).** Calmodulin and calcium channel blockers. *Hypertension* 9: 217-223.
- WINQUIST R. J.; BUNTING P. B., BASKIN E. P. y WALLACE A. A. (1984).** Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *J. Hypertension* 2: 541-546.
- WOOD A. J. J. (1989).** Calcium antagonists. Pharmacologic differences and similarities. *Circulation* 80: IV 184- IV 188.
- WRIGHT G. L. y RANKIN G. O. (1982).** Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am. J. Physiol.* 243: H365 - H370.
- WORLEY J. F.; QUAYLE J. M.; STANDEN N. B. y NELSON M. T. (1991).** Regulation of single calcium channels in cerebral arteries by voltage, serotonin, and dihydropyridines. *Am. J. Physiol.* 261: H1951-1960.
- WRIGHT G. L.; TORASSON M. A.; BARBE J. S. y CROUSE W. (1980).** The concentration of ionic and total calcium in plasma of the spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 1494-1499.
- WU C. C. y BOHR D. F. (1990).** Role of endothelium in the response to endothelin in hypertension. *Hypertension* 16: 677-681.
- WUYTACK F. y RAEYMAEKERS L. (1992).** The  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPases from the plasma membrane. *J. Bioenerg. Biomemb.* 3: 285-296

**WUYTACK F.; RAEYMAEKERS L., VERBIST J. y CASTEELS R. (1987).** The role of calcium in biological systems Ed. Anghileri L J. CRC Press Bova Florida. pp: 115-162.

**WYSE D. G.; VAN PETTEN G. R. y HARRIS W. H. (1977).** Responses to electrical stimulation, noradrenaline, serotonin, and vasopressin in the isolated ear artery of the developing lamb and ewe. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 1001-1006.

**YAMAMOTO H.; HWANG O. K. y VAN BREEMEN C. (1984).** Bay K 8644 differentiates between potential and receptor operated  $Ca^{2+}$  channels. *Eur. J. Pharmacol.* 102: 555-557.

**YAMAMURA H.; SCHOEMAKER H.; BOLES R. G. y ROESKE W. R. (1982).** Diltiazem enhancement of  $^3H$  nitrendipine binding to calcium channel associated drug receptor sites in rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 640-646.

**YAMAZAKI J.; FUJITA N. y NAGAO T. (1991).**  $N^G$ - Monomethyl- L-arginine-induced pressor response at development and established stages in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 52-57.

**YANAGISAWA M.; KURIHARA H.; KIMURA S.; TOMOBE Y.; KOBAYASHI M.; MITSUI Y.; YAZAKI Y.; GOTO K. y MASAKI T. (1988).** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.

**YANAGISAWA M. y MASAKI T. (1989a).** Molecular biology and biochemistry of the endotelins. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 374-378.

**YANAGISAWA M. y MASAKI T. (1989b).** Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1877-1883.

**YANG S. T.; MAYHAN W. G.; FURACI F. M. y HEISTAD D. D. (1991).** Endothelium-dependent responses of cerebral blood vessels during chronic hypertension. *Hypertension* 17: 612-618.

**YATANI A .; SEIDEL C. L. y ALLEN J. (1987).** Whole-cell and single-channel calcium currents of isolated smooth muscle cells from saphenous vein. *Circ. Res.* 60: 523-533.

**YOSHIDA M.; LATIFPOUR J. y WEISS R. M. (1992).** Age-related changes in calcium antagonist receptors in rabbit ureter. *Dev. Pharmacol. Ther.* 18: 100-107.

**YOUNG E. W.; BUKOSKI R. D. y McCARRON D. A. (1988).** Calcium metabolism in experimental hypertension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187: 123-141.

**YOUNG E. W.; HSU C. H.; PATEL S.; SIMPSON R. U. y KONAMICKY P. (1990).** Differential modulation by basilar and mesenteric endothelium of angiotensin-induced contraction in canine arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 180: 209-216.

**ZEMEL M. B.; BEDFORD B. A.; ZEMEL P. C.; GUALDONI S. M.; FELICETTA J. V.; SUNTHEIMER C. y SOWERS J. R. (1987).** Altered cation transport in diabetic hypertension. *Clin. Res.* 35: 853 A.

**ZEMEL M. B. y SOWERS J. R. (1990).** Calcium-regulatory hormones in hypertension. En: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Eds Laragh J H y Brenner B M. Raven Press, New York. pp: 547-563.

**ZERNING G. (1990).** Widenig potencial for  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists: non L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel interaction. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 38-44.